

*„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das
Unerforschliche zu verehren“*

Johann Wolfgang von Goethe

Deutsches Rheumaforschungszentrum

Dissertation

In vivo und in vitro Immunregulation durch T- und B-Lymphozyten: Die besondere Rolle von CTLA-4

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie eingereicht an der Mathematischen Fakultät I der Humboldt-Universität
zu Berlin

Diplom-Biologin Dagmar Gärtner 29.07.1975, Stollberg

Dekan: Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Richard Lucius
2. PD Dr. Monika C. Brunner-Weinzierl
3. PD Dr. Gabriela Riemekasten

eingereicht: 22.02.2006

Datum der Promotion: 04.07.2006

Abstrakt

Die adaptive Immunantwort wird von T- und B-Lymphozyten realisiert. Nachdem der Antigenrezeptor auf T-Zellen durch die Interaktion mit einem MHC-Peptid Komplex auf APZ getriggert wurde, sind kostimulatorische Moleküle ein zweiter Kontrollpunkt für die Immunantworten interagierender Zellen. Für das Abschalten von ungewollten Immunantworten, z.B. Autoimmunantworten, sind Moleküle der kostimulatorischen Molekülfamilien auf den T- und B-Zellen von außerordentlicher Bedeutung. Ein zentrales kostimulatorisches Molekül ist das Molekül CTLA-4.

Wir untersuchten den Einfluss von regulatorischen Zellen auf den Verlauf einer EAE, die durch einen Wechsel von Remission und Rezidiv gekennzeichnet ist. Neben den $CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA-4^+$ T-Zellen konnten wir ebenfalls $CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA-4^+$ T-Zellen in den das Gehirn infiltrierenden Lymphozyten sichtbar machen. Wir fanden gleiche Zahlen an $CD4^+CD25^+$ Zellen, die auch intrazellulär CTLA-4 exprimierten, während der akuten Phase und ersten Remission, wobei aber Oberflächen $CTLA-4^+CD4^+$ Zellen während der akuten Phase deutlich erhöht waren.

Eine Depletion der natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen vor dem Auslösen einer EAE führte zu einem schnelleren Krankheitsausbruch und schwererem sekundär progressivem Krankheitsverlauf. Obwohl die erste Remission von der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion unbeeinflusst blieb, konnten bereits im ersten Krankheitsschub signifikant erhöhte Antigen spezifische proinflammatorische Zytokine der T-Zellen detektiert werden. Damit wird deutlich, dass der sekundär progressive Verlauf durch $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion bereits zeitig während des Krankheitsverlaufes eingeleitet wird.

Wir konnten CTLA-4 ebenfalls in B-Zellen nachweisen. Die Expression von intrazellulärem und Oberflächen CTLA-4 in aktivierten B-Zellen ist strikt T-Zellen abhängig und hat ihr Maximum 48-72h nach Stimulation *in vitro*. Durch den Einsatz hochsensitiver Zellanreicherungsverfahren konnte der Nachweis der mRNA für CTLA-4 in den B-Zellen aus T-Zellabhängigen Zellkultursystemen erbracht werden. Die Induktion der mRNA für CTLA-4 kann unter bestimmten Umständen durch CD19 Kreuzvernetzung in B-Zellen erfolgen. Durch den Einsatz von Knochenmarkschimären, in denen CTLA-4 spezifisch nur in B-Zellen deletiert wird, konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 in B-Zellen die primäre IgE und IgM und die sekundäre IgM Produktion in Thymus abhängigen Immunantworten steuert. Diese Daten implizieren für alle Thymus abhängigen Immunantworten eine noch komplexere Regulation, bei der CTLA4 in B-Zellen deren Effektorfunktion intrinsisch modulieren kann.

Autoimmunität, Kostimulation, CTLA-4, Lymphozyten

Abstract

T and B lymphocytes carry out the adaptive immune response. After the antigen receptor on T cells is triggered through interaction with an MHC:peptide complex on APCs, costimulatory molecules are a second checkpoint for immune responses of interacting cells. To terminate unwanted immune responses, such as autoimmune responses, molecules of the costimulatory molecule family on T and B cells are of great importance. A central costimulatory molecule is CTLA-4 (CD152).

We investigated the influence of regulatory cells on the course of an EAE, a disease marked through alterations of remission and relapses. Apart from the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ T cells we also detected CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ T cells within the brain-infiltrating lymphocyte population. Furthermore we found similar numbers of CD4⁺CD25⁺ cells that also expressed intracellular CTLA-4, during the acute phase and first remission from EAE, whereas surface CTLA-4⁺CD4⁺ cells were clearly elevated during the acute phase.

The depletion of the natural occurring CD4⁺CD25⁺ T_{reg} cells before EAE induction leads to an accelerated disease onset and an increase in disease severity combined with a secondary progressive disease course. Even though the first remission was unaffected by the depletion of CD4⁺CD25⁺ T_{reg} cells before disease induction, the antigen specific proinflammatory cytokine production of T cells during the acute phase was already significantly increased. The data show, that the secondary progressive disease course after CD4⁺CD25⁺ T_{reg} cell depletion is already determined early during the course of EAE.

On a second approach we found CTLA-4 expression as well on B lymphocytes. The expression of intracellular and surface CTLA-4 on activated B cells is strictly T cell dependent and the expression is maximal 48-72h after stimulation in vitro. Through the use of highly sensitive cell sorting strategies we were able to detect the mRNA for CTLA-4 in B cells cultured with activated T cells. CTLA-4 mRNA in B cells is inducible in isolated B cells via crosslinking of CD19 in vitro.

We generated bone marrow chimeric mice, in which only B cells were CTLA-4 deficient. With these mice we could show, that CTLA-4 on B cells controls the primary IgE and IgM, as well as the secondary IgM production in thymus dependent immune responses. These data imply a more complex regulation of thymus dependent immune responses, in which CTLA-4 on B cells can modulate B cell effector functions.

autoimmunity, costimulation, CTLA-4, lymphocytes

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1 EINLEITUNG	8
1.1 DAS IMMUNSYSTEM	8
1.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM	9
1.2.1 Die T-Zellen.....	10
1.2.1.1 Effektormechanismen von CD4 ⁺ T-Zellen.....	11
1.2.1.2 Regulatorische T-Zellen.....	12
1.2.2 Die B-Zellen	13
1.2.2.1 Klassische B-Zellfunktionen.....	14
1.2.2.2 Antikörper unabhängige Effektorfunktionen von B-Zellen – B-Zellen als Immunregulator	16
1.2.3 Kostimulatorische Moleküle	17
1.2.3.1 Retrograde Signalübertragung und alternative Expression für Kostimulatoren.....	19
1.2.3.2 Das Molekül CTLA-4	20
1.2.3.2.1 CTLA-4 als Immunregulator	21
1.2.3.2.2 B-Zellen und CTLA-4.....	22
1.3 DIE AUTOIMMUNKRANKHEIT MULTIPLE SKLEROSE	23
1.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	24
1.3.1.1 Mechanismen der Remission – besondere Rolle von regulatorischen T-Zellen	26
2 FRAGESTELLUNG.....	28
3 MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1 MATERIAL.....	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Plastikartikel und Zellkulturgefäße	30
3.1.3 Puffer und Medien.....	31
3.1.4 weitere Chemikalien, Lösungen, Oligomere und Zellkulturzusätze	32
3.1.5 Mäuse.....	33
3.1.6 Antikörper.....	34
3.2 METHODEN	34
3.2.1 Durchflusszytometrie	34
3.2.1.1 Markierung von Oberflächenantigenen.....	35
3.2.1.2 Markierung von intrazellulären Antigenen	35
3.2.2 Reifung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	36
3.2.3 Zellanreicherung mittels MACS und FACS Technologie	36
3.2.4 Kultivierung und Stimulation der B- und T-Zellen	38
3.2.4.1 Zellkultur zur Generierung von Th2-Effektorzellen und anschließende Zellkultur der Th2-Zellen mit T-Zelldepletierten Milzzellen	38
3.2.4.2 Milzzellkulturen mit dem polyklonalen Stimulator Con A	38
3.2.4.3 Zellkultur und Stimulation der angereicherten B-Zellen.....	39

3.2.5	<i>RNA Isolation, cDNA-Herstellung, PCR und Gelelektrophorese</i>	40
3.2.6	<i>Zucht, Etablierung der PCR und genetische Typisierung von CTLA-4^{-/-} Tieren</i>	41
3.2.7	<i>Induktion einer EAE</i>	42
3.2.8	<i>Adoptiver Transfer von inflammatorischen Zellen zur Induktion einer EAE</i>	43
3.2.9	<i>Depletion von CD4⁺CD25⁺ Zellen in vivo</i>	43
3.2.10	<i>Isolation von Lymphozyten aus dem ZNS</i>	44
3.2.11	<i>Histologische Markierung von Lymphozyten im Gehirngewebe</i>	44
3.2.12	<i>Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen mittels ELISA</i>	44
3.2.13	<i>Herstellung von Knochenmarkschimären</i>	45
3.2.14	<i>Immunisierung zur Induktion von Antikörperantworten und Serumgewinnung</i>	46
3.2.15	<i>Nachweis der natürlichen Ak und der DNP-spezifischen Ak mittels ELISA mit Seren aus den Knochenmarkschimären</i>	46
3.2.16	<i>Statistische Analysen</i>	47
4	ERGEBNISSE	48
4.1	EINFLUSS REGULATORISCHER ZELLEN AUF DIE REMISSION UND DEN KRANKHEITSVERLAUF VON R-EAE	48
4.1.1	<i>Charakterisierung von T-Zellen mit regulatorischem Potential in verschiedenen Krankheitsphasen einer EAE</i>	48
4.1.1.1	Foxp3 ⁺ , CTLA-4 ⁺ und CD25 ⁺ CD4 T-Zellen im ZNS von Mäusen mit EAE	48
4.1.1.2	<i>In vivo</i> Untersuchung des regulatorischen Potentials von Zellen aus dem Entzündungsherd während der ersten Remission von EAE	52
4.1.1.3	Zahl der Oberflächen CTLA-4 ⁺ CD4 ⁺ Zellen ist im ZNS der Mäuse in akuter Phase am höchsten	53
4.1.1.4	CD4 ⁺ T-Zellen im Gehirn von CTLA-4 ^{-/-} Mäusen	55
4.1.2	<i>CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kontrollieren sekundäre aber nicht primäre Remission von EAE</i>	56
4.1.2.1	Depletion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen vor Krankheitsinduktion verhindert die erste Remission nicht	56
4.1.2.2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} Zelldepletion in SJL/J Mäusen führt zu sekundär progressivem Krankheitsverlauf mit verminderten Remissionen und CD4-Zellinfiltraten im ZNS	59
4.1.2.3	Sekundär progressive Verlaufsform nach CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} Zelldepletion wird bereits während der akuten Phase der EAE eingeleitet	62
4.2	CTLA-4 EXPRESSION IN B-ZELLEN BEEINFLUSST DIE ANTIKÖRPERPRODUKTION WÄHREND THYMUS ABHÄNGIGER IMMUNANTWORTEN	65
4.2.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Rolle von CTLA-4 in B-Zellen	65
4.2.1.1	Der Einfluss anderer Immunzellen und Stimulationsbedingungen auf die Expression von CTLA-4 in B-Zellen	65
4.2.1.2	Kinetik der intrazellulären CTLA-4 Proteinexpression in B-Zellen	70
4.2.1.3	Expression von CTLA-4 in B-Zellen ist Mausstamm unabhängig	71
4.2.1.4	CTLA-4 in B-Zellen ist kein Molekültransfer von T-Zellen	72
4.2.1.5	Oberflächenexpression von CTLA-4 auf B-Zellen	75
4.2.1.6	mRNA-Nachweis für CTLA-4 in B-Zellen	77
4.2.1.7	CD19 Antikörper-Vernetzung induziert CTLA-4 mRNA Expression in B-Zellen	79
4.2.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Rolle von CTLA-4 in B-Zellen	82
4.2.2.1	Zellrekonstitution und natürliche IgM und IgG Antikörper unterscheiden sich nicht in CTLA-4 ^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber CTLA-4 ^{+/+} B-Zellen Chimären	82

4.2.2.2	Antigen spezifische IgM-Antworten in CTLA-4 ^{-/-} B-Zellen Chimären sind nach primärer und sekundärer Immunisierung erhöht	85
5	DISKUSSION	90
5.1	EINFLUSS REGULATORISCHER ZELLEN AUF DIE REMISSION UND DEN KRANKHEITSVERLAUF VON R-EAE	90
5.1.1	<i>Zellzusammensetzung in früher Phase der EAE – die Bedeutung von CTLA-4⁺ T-Zellen.....</i>	<i>90</i>
5.1.2	<i>CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen in der frühen Phase der EAE.....</i>	<i>93</i>
5.1.3	<i>CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen in der späten Phase der EAE.....</i>	<i>95</i>
5.1.4	<i>Sekundär progressive Verlaufsform der EAE wird durch CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen bereits zu Beginn der Krankheit bestimmt - Ausblick</i>	<i>96</i>
5.2	CTLA-4 EXPRESSION IN B-ZELLEN BEEINFLUSST THYMUS ABHÄNGIGE IMMUNANTWORTEN	98
5.2.1	<i>CTLA-4 Expression in B-Zellen ist T-Zellen abhängig</i>	<i>98</i>
5.2.2	<i>5.2.2. CTLA-4 in B-Zellen entsteht aus zelleigener Synthese</i>	<i>100</i>
5.2.3	<i>Mögliche Interaktionspartner für Oberflächen CTLA-4 auf B-Zellen.....</i>	<i>101</i>
5.2.4	<i>CTLA-4 Induktion durch CD19-Signale</i>	<i>102</i>
5.2.5	<i>CTLA-4 auf B-Zellen reguliert die primäre und sekundäre IgM Produktion während Thymus abhängiger Immunantworten in vivo</i>	<i>103</i>
5.2.6	<i>Immunregulation der EAE durch CTLA-4 in B-Zellen – Ausblick.....</i>	<i>106</i>
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
	LITERATUR.....	110
	ABKÜRZUNGEN.....	134
	LEBENS LAUF.....	136
	DANKSAGUNG.....	141
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	142

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch Erreger aus der Umwelt. Es besteht aus mehreren Komponenten, den Immunzellen, löslichen Faktoren, den lymphatischen Geweben und Organen, welche über den gesamten Organismus verteilt sind.

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Diskriminierung zwischen körpereigenen (selbst) harmlosen Substanzen und körperfremden (fremd) und daher in der Regel pathogenen Substanzen. Krankheitsinduzierende Pathogene oder Mikroorganismen lassen sich in vier Kategorien einteilen: Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Gelingt es dem Körper mit Hilfe des Immunsystems gegen diese „fremden“ Erreger vorzugehen, kann die biologische Integrität des Organismus gewährleistet werden.

Die gleichen Immunzellen, welche effektiv Pathogene erkennen und beseitigen, können sich bei Fehlregulationen auch gegen den Körper wenden und Autoimmunität hervorrufen. Das Phänomen der Autoimmunität wurde bereits vor 100 Jahren von Paul Ehrlich als *Horror autotoxicus* beschrieben [1]. Erkennt das Immunsystem Komponenten des „Selbst“ als fremd, kann dies zu Autoimmunkrankheiten führen. Zahlreiche Autoimmunkrankheiten sind bekannt, unter anderem Rheumatoide Arthritis (RA), systemischer Lupus erythematoses (SLE), Diabetes mellitus Typ 1, Glomerulonephritis, Myasthenia gravis und Multiple Sklerose (MS). Gleichermaßen unerwünschte Immunpathologien liegen im Fall von Allergien vor, bei denen das Antigen eine harmlose körperfremde Substanz ist, oder auch Krebserkrankungen, bei denen das Immunsystem die entarteten Zellen als körpereigen toleriert.

Das Immunsystem höherer Vertebraten wird in das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem unterschieden. Zu den Zellen der angeborenen Immunität zählen Monozyten/Makrophagen, die dendritischen Zellen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Makrophagen und dendritische Zellen treten außerdem als professionelle Antigen präsentierende Zellen (APZ) in adaptiven Immunantworten auf [2, 3]. Das angeborene Immunsystem stellt die erste schnelle Abwehrlinie des Körpers gegen Infektionen dar. Eindringende Mikroorganismen werden gebunden und durch Internalisierung zerstört.

1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunität wird durch die Lymphozyten vermittelt. Die beiden Klassen der Lymphozyten sind die B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen). Das adaptive Immunsystem zeichnet sich gegenüber dem angeborenen Immunsystem durch größere Effizienz, spezifische Erkennung und Abwehr von infektiösen Mikroorganismen und der Bildung eines Gedächtnisses aus. Im adulten Organismus entstehen die B- und T-Zellen aus pluripotenten Stammzellen im Prozess der Hämatopoese im Knochenmark. Letztere haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, und sich zu verschiedenen Vorläuferzellen mit nunmehr eingeschränktem Differenzierungspotential zu entwickeln. Die Lymphozyten entstehen und reifen dabei aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor (CLP)), in den primären lymphatischen Organen des Knochenmarks und des Thymus. Orte, in denen adaptive Immunantworten initiiert werden, sind die sekundären lymphatischen Organe, wie Milz, Lymphknoten und mukosaassoziierte lymphatische Gewebe, zu denen Tonsillen oder Peyersche Plaques zählen [4, 5]. Antigene aus dem Blut werden dabei in der Milz, Antigene aus befallenen lokalen Geweben in den Lymphknoten und Antigene der epithelialen Oberflächen des Körpers von mukosaassoziierten lymphatischen Geweben aufgenommen.

Die im Grunde unlimitierte Spezifität des adaptiven Systems schafft ein effizientes Gegengewicht zu den kurzen Reproduktionszyklen und hohen Mutationsraten infektiöser Mikroorganismen. Die Antigen spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten bestehen aus verschiedenen Ketten, die sich in konstante und variable Abschnitte unterteilen. Die Vielfalt der Antigen spezifischen Rezeptoren wird unter anderem durch die zufällige Generierung der Rezeptoren durch den Prozess der somatischen Rekombination in sich entwickelnden Lymphozyten erreicht. Im Prozess der somatischen Rekombination wird in B- und T-Lymphozyten die Zusammensetzung der variablen Ketten der Antigen-Rezeptoren durch die zufällige Kombination hunderter verschiedener Gensegmente des Typs V, D und J bzw. nur V und J herbeigeführt. Das Lymphozyten-Rezeptor-Repertoire umfasst ca. 10^{13} verschiedene TZR und ca. 10^{11} verschiedene BZR, denn neben der somatischen Rekombination gibt es weitere Prozesse, z.B. die somatische Hypermutation in B-Zellen, die in ihrer Summe die hohe Anzahl an Rezeptoren entstehen lassen [6, 7]. Ein weiteres Merkmal der adaptiven Immunantwort ist die Gedächtnisbildung, wobei am Ende einer spezifischen Immunantwort Antigen spezifische Zellen als Gedächtniszellen überleben. Dies bewirkt eine schnellere und effizientere Beseitigung von erneut eintretenden Erregern, meist ohne klinische Symptome des Organismus.

1.2.1 Die T-Zellen

Die Spezifität der T-Zellen wird durch den individuellen T-Zell Rezeptor (TZR) jeder T-Zelle, welcher ein spezifisches Antigen erkennt, herbeigeführt.

T-Zellen erkennen Antigene nur, wenn diese durch die „major histocompatibility complex“ (MHC) Moleküle auf APZ gebunden sind [8]. Jeder TZR erkennt dabei nur eine bestimmte Kombination aus MHC und Antigen (MHC-Restriktion). 95% der peripheren T-Zellen tragen einen TZR aus α und β Ketten, der mit dem CD3 Molekül assoziiert ist. Eine kleine Population an T-Zellen trägt einen TZR aus γ und δ Ketten, der nicht von der Bindung an MHC Moleküle abhängig ist und wahrscheinlich sogar lösliche Antigene erkennen kann [4]. α/β T-Zellen entstehen aus einer Vorläuferzelle (CLP) im Knochenmark, aber die Hauptentwicklungsschritte erfolgen im Thymus [5]. Im Thymus werden die T-Zellen während ihres Reifungsprozesses der sogenannten positiven und negativen Selektionen unterzogen. Bei der positiven Selektion werden zunächst alle Thymozyten am Leben erhalten, die Selbst-MHC:Selbst-Peptid Komplexe erkennen. Die zweite Selektion ist die negative Selektion, bei der potentiell autoreaktive T-Zellen, die „Selbst-Peptide“ erkennen, im Thymus deletiert werden [9]. Dieser Mechanismus trägt zur Aufrechterhaltung der Toleranz bei und wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Gelingt es T-Zellen, dieser Regulation zu entgehen und die Peripherie zu erreichen, gibt es weitere Mechanismen zur Kontrolle dieser Zellen, zusammengefasst unter dem Begriff der peripheren Toleranz. Hierzu werden die Deletion, die Anergie und die Induktion regulatorischer T-Zellen gezählt. Beim Vorgang der Deletion werden, ähnlich wie im Thymus, autoreaktive Zellen deletiert und damit unschädlich gemacht [10]. Im Zuge der Anergie werden autoreaktive Zellen durch die Stimulation mit Autoantigenen inaktiviert. Sie nehmen einen anergen Zustand ein, d.h., sie proliferieren nicht mehr und produzieren keine Effektorzytokine [11]. Auf die Induktion und Rolle der regulatorischen T-Zellen (welche im Thymus oder der Peripherie generiert werden) wird später eingegangen (1.2.1.2.).

Reife, den Thymus verlassende T-Zellen können in zwei große Gruppen, entsprechend ihrer Korezeptor Expression, eingeteilt werden. Die $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptide (Antigene), die durch MHC Moleküle der Klasse I präsentiert werden. Antigene, die auf MHC I präsentiert werden, sind endogene Antigene aus Viren oder Bakterien, die sich im Zytosol vermehren. $CD8^+$ T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, sind vor allem für die Beseitigung virusinfizierter bzw. tumorartig veränderter Zielzellen verantwortlich. Die zweite große Gruppe umfasst die $CD4^+$ T-Zellen, welche exogene Antigene aus

beispielsweise Bakterien, die auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden, erkennen und durch ihre Effektorfunktionen zur Beseitigung der Pathogene beitragen [4].

T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunität, bei der Zellinteraktionen über MHC:Peptidkomplexe mit der Zielzelle notwendig sind, und die T-Zellen sofortige Effektorfunktionen ausführen.

1.2.1.1 Effektormechanismen von CD4⁺ T-Zellen

Trifft eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen und wird diese aktiviert kommt es zur Proliferation und Differenzierung, so dass es zur Bildung eines für dieses Antigen spezifischen Klons von Effektor-T-Zellen kommt. Eine Klasse an Effektormolekülen der T-Zellen sind die sezernierten, löslichen Zytokine. Diese wirken in autokriner Form, die das Zytokin produzierende Zelle erhält das Signal, oder in parakriner Form, das Zytokin erreicht die APZ oder andere Nachbarzellen. Anhand der von den T-Zellen gebildeten Zytokine lassen sich diese in T-Helfer 1 (Th1) und T-Helfer 2 (Th2) Zellen unterteilen.

Die Th1-Zellen produzieren vorrangig Zytokine wie IFN- γ , IL-2, TNF- α oder auch Lymphotoxin - β (LT- β) und steuern die Produktion von Antikörpern, vornehmlich IgG2a. Th2 Zellen sezernieren vor allem Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 oder auch IL-13 und sorgen für die Produktion von Antikörpern, beispielsweise IgG1 und IgE [12]. Naive T-Zellen können nach Aktivierung zu Th1- oder Th2-Zellen differenzieren, wobei die TZR Stärke, die Antigendosis, die Expression zusätzlicher Moleküle auf den APZ und das Zytokinmilieu diese Differenzierungsrichtung beeinflussen [13]. Th1-Zellen bekämpfen durch Aktivierung von Makrophagen vor allem intrazelluläre Pathogene wie beispielsweise Protozoen des Typs *Leishmania*, wohingegen Th2-Zellen vor allem die Antikörperproduktion von B-Zellen (humorale Immunantwort) anregen und damit maßgeblich an der Beseitigung extrazellulärer Erreger, beispielsweise von Nematoden wie *Nippostrongylus brasiliensis*, beteiligt sind.

Im Falle von Immunpathologien wurden Th1-T-Zellen vor allem bei Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ 1 oder auch Rheumatoider Arthritis als Effektor-T-Zellen identifiziert [14]. Th2 Zytokine produzierende T-Zellen treten vor allem während der Autoimmunkrankheit systemischer Lupus erythematoses oder anderen Immunpathologien, wie Allergien, Asthma und reaktiver Arthritis auf. Letztere Krankheit entsteht durch den Aufbau der Th2 Immunantwort anstelle einer Th1-Antwort, diese Th1-Antwort könnte die für die Krankheit verantwortlichen intrazellulären Erreger bekämpfen [15].

1.2.1.2 Regulatorische T-Zellen

Die Idee einer suppressorisch wirkenden T-Zellsubpopulation wurde bereits 1971 von Gershon und Kollegen postuliert [16]. Diese T-Zellpopulation wurde identifiziert, wird durch die Expression von CD4 und CD25 charakterisiert und macht 5-10% der CD4⁺ Zellen in der Peripherie aus [17]. Die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) supprimieren zahlreiche Immunantworten, unter anderem in immunologischen Reaktionen bei Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung und in der Tumorummunologie [18, 19, 20]. Die CD4⁺CD25⁺ T_{reg} werden im Thymus und der Peripherie von Mäusen, Ratten und Menschen gefunden. Die T_{reg} Zellen entstehen, zumindest zu einem hohen Prozentsatz, im Thymus und verlassen diesen im reifen Zustand, um in die Peripherie zu wandern [21]. Weitere Studien zeigen, dass CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen aus naiven CD4⁺CD25⁻ Zellen durch Agonist-Peptid-Liganden [22] oder TGF-β in einem Asthma-Modell [23] in der Peripherie konvertiert sind. Beide Differenzierungswege für CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen könnten möglich sein.

Neben der Expression von CD25 wurden zahlreiche Moleküle, unter anderem CTLA-4 und GITR, zur Identifizierung von T_{reg} Zellen beschrieben, welche zur Effektorfunktion dieser Zellen beitragen [24, 25]. Kennzeichen aller T_{reg} Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 [20, 26]. Neben den CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} Zellen wurden kürzlich auch CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen beschrieben, was bedeutet, dass alle Foxp3⁺ Zellen, unabhängig von der CD25 Expression, regulatorische Kapazität besitzen [27].

Die Regulation der T_{reg} Zellen besteht in aller Regel in der Inhibition der Proliferation und Zytokinproduktion von Effektor-T-Zellen. Im humanen Organismus ist aber auch ein Perforin abhängiger Zelltod der Effektor-T-Zellen durch T_{reg} Zellen beschrieben [28]. Außerdem wurde eine Veränderung von Chemokinrezeptoren (ermöglichen Migration von Zellen) auf Effektor-T-Zellen durch T_{reg} Zellen beobachtet [29].

Verschiedene Mechanismen der Suppression der Proliferation und Zytokinproduktion durch T_{reg} Zellen sind beschrieben. *In vitro* ist die Suppression durch T_{reg} Zellen Zell-Zell Kontakt abhängig, wobei die Suppression *in vivo* vor allem über lösliche Mediatoren gesteuert wird [19, 25]. Viele verschiedene Moleküle, außer CTLA-4 und GITR, z.B. CD80 und CD86 auf APZs, Zytokine wie IL-10 und TGF-β, sowie der Wachstumsfaktor IL-2, um welchen Effektor- und Regulator-T-Zelle konkurrieren, können die suppressorische Wirkung der T_{reg} Zellen steuern [25, 30]. Denkbar wäre eine komplexe Steuerung der Suppression durch eine Kombination verschiedener Mechanismen.

Weitere CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischem Potential wurden beschrieben, so z.B IL-10 produzierende T-Zellen, die andere T-Zellen über IL-10 supprimieren [31] [32]. Die Induktion solcher IL-10 produzierender Tr1 Zellen konnte auch in einem Mausmodell für die Autoimmunkrankheit SLE nachgewiesen werden [33]. Eine weitere Gruppe immunsuppressorischer T-Zellen stellen die Th3 Zellen dar, die über die Produktion von TGF- β Zielzellen kontrollieren [34]. Außerdem wurden regulatorische T-Zellen der CD8 Zelllinie identifiziert, welche CD4 Zellen supprimieren können [35].

1.2.2 Die B-Zellen

Der die Spezifität der B-Zellantwort ausmachende B-Zell-Rezeptor (BZR) ist ein membranständiges Antikörpermolekül, das durch eine zusätzliche hydrophobe Transmembrandomäne auf der Oberfläche von B-Zellen verankert ist. B-Zellen werden in B-2 (konventionelle B-Zellen) und B-1 B-Zellen eingeteilt. Sie unterscheiden sich in ihrer Herkunft, Oberflächenrezeptorexpression, Verteilung im Organismus und ihrer Funktion in Immunantworten. Im Folgenden wird der Terminus B-Zellen im Sinne konventioneller B-2-Zellen angewandt.

B-Zellen entwickeln sich aus „common lymphoid progenitor“ Zellen im Knochenmark und verlassen als unreife, einen B-Zellrezeptor (BZR) tragende Zellen ihren Entstehungsort über das Blut, um in die Milz zu wandern, wo ihre weitere Reifung stattfindet [5].

Unreife B-Zellen der Milz durchlaufen verschiedene Reifungsstadien. Dies sind die transitionalen Stadien T1, T2 und T3, charakterisiert durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle [36]. Die reifen B-Zellen der Milz werden in zwei große Gruppen, die Marginalzonen- und die follikulären B-Zellen, unterteilt. Erstere machen zirka 10% der reifen B-Zellen aus, kommen nur in der Milz vor und lokalisieren vor allem an der Grenze der weißen Pulpa. Die follikulären B-Zellen dagegen können in verschiedene Organen rezirkulieren und besiedeln die Follikel in Milz und Lymphknoten [36]. Aus follikulären B-Zellen können infolge einer Thymus abhängigen Immunantwort Keimzentren-B-Zellen werden, die in den entstandenen Keimzentren unter T-Zell-Hilfe weiter differenzieren. B-Zellen bilden nach Beendigung einer Immunantwort Antigen spezifische Gedächtniszellen, die bei erneuter Infektion schnell auf das Antigen reagieren können. Plasmablasten sind ein Vorläuferstadium der Plasmazellen. Diese Zellen sezernieren bereits Antikörper, besitzen zudem aber noch die Fähigkeit sich zu teilen. Terminal differenzierte B-Zellen werden Plasmazellen genannt, sie proliferieren nicht mehr und sezernieren Antikörper. Marginalzonen B-Zellen, follikuläre B-Zellen, aktivierte Keimzentren-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen können in Abhängigkeit des Antigens zu

Plasmazellen differenzieren. Plasmazellen können wiederum in kurzlebige (überleben nur einige Tage in extrafollikulären Bereichen) oder langlebige (ihre Halbwertszeit in der Maus beträgt ca. 6 Monate) Plasmazellen eingeteilt werden. Letztere überleben vornehmlich im Knochenmark und z.B. im Falle von SLE im entzündlichen Gewebe [37, 38].

1.2.2.1 Klassische B-Zellfunktionen

B-Zellen sind Effektorzellen der humoralen Immunantwort, die Antikörper (Ak, Immunoglobuline) produzieren und sezernieren. Die von Plasmazellen sezernierten Antikörper haben die gleiche Spezifität wie die membranständigen Ak (BZR) der reifen B-Zellen, die in Folge einer Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren. Antikörper bestehen aus 2 leichten und 2 schweren Ketten, welche jeweils konstante und variable Regionen aufweisen. Die erste Linie der humoralen Immunabwehr leisten die B1-B-Zellen. Sie produzieren die natürlichen Antikörper, welche in der Frühphase einer systemischen bakteriellen Infektion eine Umverteilung der Pathogene von peripheren Organen hin zu sekundär lymphatischen Organen des Immunsystems bewirken [39]. Natürliche Antikörper sind in größerer Zahl von der IgM Subklasse, aber auch von den IgG Subklassen [40], und richten sich gegen Nukleinsäuren, Hitzeschockproteine, Kohlenhydrate und Phospholipide. B-Zellen können Thymus abhängig (TD für thymus dependent) oder Thymus unabhängig (TI für thymus independent) stimuliert werden. In beiden Fällen erkennt die B-Zelle ein Antigen über ihren B-Zellrezeptor. Im Falle der T-Zellabhängigen Immunantwort werden anschließend Fragmente des Antigens über MHC Klasse II Moleküle für T-Zellen präsentiert, so dass T-Zellen in Interaktion mit B-Zellen gleicher Antigen-Spezifität treten. Im Falle der Thymus unabhängigen Aktivierung von B-Zellen aktivieren meist repetitive Strukturen des Antigens zusätzliche BZR Moleküle bzw. toll like receptors (TLR) auf der B-Zelloberfläche, so dass es zur vollen Aktivierung der B-Zellen kommt.

Handelt es sich um einen TD Stimulus, werden die B-Zellen aktiviert und bilden entweder Keimzentren oder differenzieren in den primären Foci gleich zu Plasmazellen. Es ist noch nicht geklärt, wodurch der Weg einer B-Zelle in die primären Foci oder in die Keimzentren gesteuert wird. Plasmazellen der primären Foci produzieren in der Immunantwort rasch Antikörper. Diese sind aber von geringer Affinität (schwacher Bindungsstärke) zum Antigen. Antikörpermoleküle lassen sich in 5 große Isotypklassen die IgM, IgD, IgG, IgA und IgE Antikörper einteilen, wobei weitere Unterklassen vor allem für die IgG Antikörper, in Mäusen: IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3, existieren. Die vorrangige Aufgabe der IgM Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems. In Folge der Anheftung bestimmter

Plasmaproteine des Komplementsystems können Pathogene direkt lysiert werden oder sie werden durch Opsonisierung für Phagozyten zugänglich gemacht.

Die konstanten Strukturen der schweren Ketten eines Antikörpers bestimmen die Zugehörigkeit zu einer Klasse. Diese Klassen erfüllen unterschiedliche Effektorfunktionen in Immunantworten. Der variable Teil der leichten und schweren Ketten des Antikörpermoleküls bildet die Antigen-Bindungsstelle. Die reifen B-Zellen in der Peripherie tragen Antikörper der Klassen IgM und IgD. Alle anderen Isotypen werden erst nach Aktivierung der Zellen gebildet. In den während TD Immunantworten gebildeten Keimzentren kommt es neben der Proliferation der B-Zellen zu weiteren Prozessen wie der somatischen Hypermutation und dem Isotypklassenwechsel. Durch den Prozess der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in die variablen Regionen der leichten und schweren Ketten eingeführt. Dies erhöht die Diversität von Antikörpern und führt in aller Regel zu Antikörpern höherer Affinität (Affinitätsreifung). Durch die Vorgänge der somatischen Rekombination, weitere Einführung von P- und N-Nukleotiden, die Kombination verschiedener schwerer und leichter Ketten und die somatische Hypermutation liegt das Antikörperrepertoire bei ca. 10^{11} . Beim Vorgang des Isotypklassenwechsels werden durch Rekombination des konstanten Teils der IgM Antikörper neue Antikörperklassen, z.B. IgG1, gebildet [41]. Die Antigen-Spezifität der Antikörper bleibt gleich. Die Gene für die konstanten Regionen der Antikörper liegen in einer bestimmten Anordnung im Gen-Cluster. Der Antikörperklassenwechsel von IgM zu einem der anderen Isotypen ist im Prinzip beliebig, jedoch gesteuert durch exogene Faktoren und irreversibel. Aufgrund der Anordnung der Gene der konstanten Regionen kann eine Zelle nach einem Klassenwechsel zu IgG später einen weiteren Wechsel zu beispielsweise IgE vollziehen. Ist eine B-Zelle aber sofort von IgM zu IgA gewechselt, kann sie keinen weiteren Klassenwechsel durchführen, denn die codierenden Bereiche für die anderen konstanten Regionen, die im Cluster zwischen IgM und IgA lagen, wurden deletiert. Für den Antikörperklassenwechsel bei TD Immunantworten sind exogene Faktoren, wie der BZR Trigger, CD40-CD40L Interaktion und das Zytokinmilieu maßgebend, so dass der Isotypklassenwechsel auch außerhalb des Keimzentrums stattfinden kann [42, 43]. Ein Isotypklassenwechsel kann auch in TI Immunantworten über die Expression von BAFF-R, TACI oder BCMA Rezeptor auf B-Zellen und deren Vernetzung durch Blys (B lymphocyte stimulator protein oder BAFF) und APRIL (a proliferation inducing ligand) auf dendritischen Zellen induziert werden [44].

1.2.2.2 Antikörper unabhängige Effektorfunktionen von B-Zellen – B-Zellen als Immunregulator

B-Zellfunktionen gehen weit über die Antikörperproduktion hinaus und reichen von Antigen-Präsentation, über kostimulatorische Funktion durch Expression und Produktion von Oberflächenmolekülen und Zytokinen, bis zur Fähigkeit in *de novo* lymphoide Gewebsorganisation einzugreifen [45]. Eine experimentelle Entfernung von B-Zellen aus dem Synovialgewebe bei rheumatoider Arthritis in der Maus zeigt, dass B-Zellen durch Antigen-Präsentation über MHC I und MHC II Moleküle die Aktivierung der T-Zellen steuern können, denn es wird in diesen Tieren trotz vorhandener professioneller APZ keine T-Zell-Immunantwort aufgebaut [46]. Außerdem sind kostimulatorische Moleküle für die B-Zellen und Immunzellen in ihrer Umgebung für erfolgreiche Immunantworten entscheidend (Kapitel 1.2.3.).

In den letzten Jahren wurden B-Zellen vermehrt als Zytokinproduzenten beschrieben, was vorher vor allem als Kennzeichen von T-Zellen bekannt war [47, 48, 49, 50]. Seit langem sind IL-6 produzierende B-Zellen identifiziert, welche durch IL-6 ihre eigene Differenzierung und Immunoglobulinsekretion beeinflussen [48]. Neuere Studien zeigen, dass B-Zellen eine ganze Reihe von Zytokinen exprimieren und sogar distinkte Effektor-B-Zellpopulationen ähnlich den Th1/Th2 Zellen bei T-Zellen bilden. Diese Be1 und Be2 genannten B-Zellpopulationen produzieren Zytokine wie IFN- γ , IL-2, IL-12 bzw. IL-4, IL-5 und IL-10 [49]. Zytokine können regulierend in Immunantworten eingreifen und spielen auch im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten eine besondere Rolle in B-Zellen. IL-6 und sein Rezeptor werden von aktivierten B-Zellen exprimiert. In Patienten mit SLE tragen B-Zellen den IL-6 Rezeptor bereits *ex vivo* und produzieren spontan anti-DNA spezifische Antikörper [51]. Ein wichtiges immunsuppressorisches Zytokin ist IL-10, welches von regulatorisch wirkenden B-Zellen gebildet wird [47] [50]. Es gibt zahlreiche Studien zur regulatorischen Wirkung von B-Zellen in chronischen Entzündungen und Fällen von Autoimmunkrankheiten [47, 50, 52]. Besonders hervorzuheben sind dabei die IL-10 produzierenden regulatorischen B-Zellen in Mausmodellen für chronische intestinale Entzündungen [47] und in Mausmodellen für MS [50]. In letzterer Studie wurde ein raffiniertes System von Knochenmarkschimären für die Analyse der B-Zellregulatorfunktion genutzt. IL-10 produzierende B-Zellen können die Remission im Mausmodell der EAE einleiten. Welche regulatorischen Oberflächenmoleküle auf B-Zellen zur Induktion und folgender Einleitung der Remission durch IL-10 eine Rolle spielen, ist gänzlich unbekannt.

1.2.3 Kostimulatorische Moleküle

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch zwei Signale. Das 1. Signal wird über die Interaktion vom TZR auf T-Zellen mit dem Peptid:MHC Komplex auf APZ bewirkt. Das 2. Signal wird vor allem durch die Ligation eines kostimulatorischen Moleküls, z.B. CD28 in T-Zellen, vermittelt [53, 54, 55]. Die kostimulatorischen Moleküle verstärken die Signalweiterleitung des TZR und dienen als Kontrollmechanismus bei der Zellaktivierung. T-Zellen bekommen zu verschiedenen Zeitpunkten einer Immunantwort als naive, Effektor- bzw. Gedächtniszellen unterschiedliche kostimulatorische Signale, wodurch die gewünschten Immunantworten schnell und effizient ausgeführt werden können. Die koordinierte Expression dieser kostimulatorischen Moleküle durch professionelle APZ kann die Reaktion des Organismus gegen körpereigene Antigene verhindern.

Die Kostimulatoren lassen sich in 2 große Molekülklassen einordnen. Zur CD28 Immunoglobulin-Familie der Rezeptoren zählen: CD28, CTLA-4 (CD152), ICOS, PD-1 und BTLA. Zur B7 Immunoglobulin-Familie der Liganden zählen: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1) PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 und B7-H4 [56] (Abb.1). Eine zweite große Familie kostimulatorischer Moleküle sind die Mitglieder der TNF- /TNF-Rezeptor Familie. APZ exprimieren CD40, Light, OX40L, CD30, CD27 und 4-1BBL. T-Zellen exprimieren CD40L (CD154), HVEM, OX40 (CD134), CD30L (CD153), CD70 und 4-1BB (CDw137) [53, 55] (Abb.1). Ein anderes kostimulatorisches Paar der Immunoglobulin-Familie ist das CD2 Molekül und sein Ligand LFA-3 (CD58) [57].

Neben der gut charakterisierten Kostimulation für T-Zellen existiert ebenso Kostimulation für B-Zellen. Es können Moleküle wie CD40 und CD30 aber auch pathogene Komponenten wie das LPS aus Bakterienwänden oder Komplementfragmente des angeborenen Immunsystems kostimulatorische Signale für B-Zellen geben. So führt beispielsweise CD40 Kreuzvernetzung auf B-Zellen durch CD40L auf T-Zellen zur Proliferation, Antikörperbildung, Entwicklung der Keimzentren, Affinitätsreifung und Gedächtnisbildung [43]. In anderen APZ, beispielsweise in dendritischen Zellen, führt Kreuzvernetzung von CD40 zur gesteigerten Zytokinproduktion und erhöhten B7 Expression [53], wobei letzteres wiederum zur Verstärkung von T-Zellreaktionen beitragen kann.

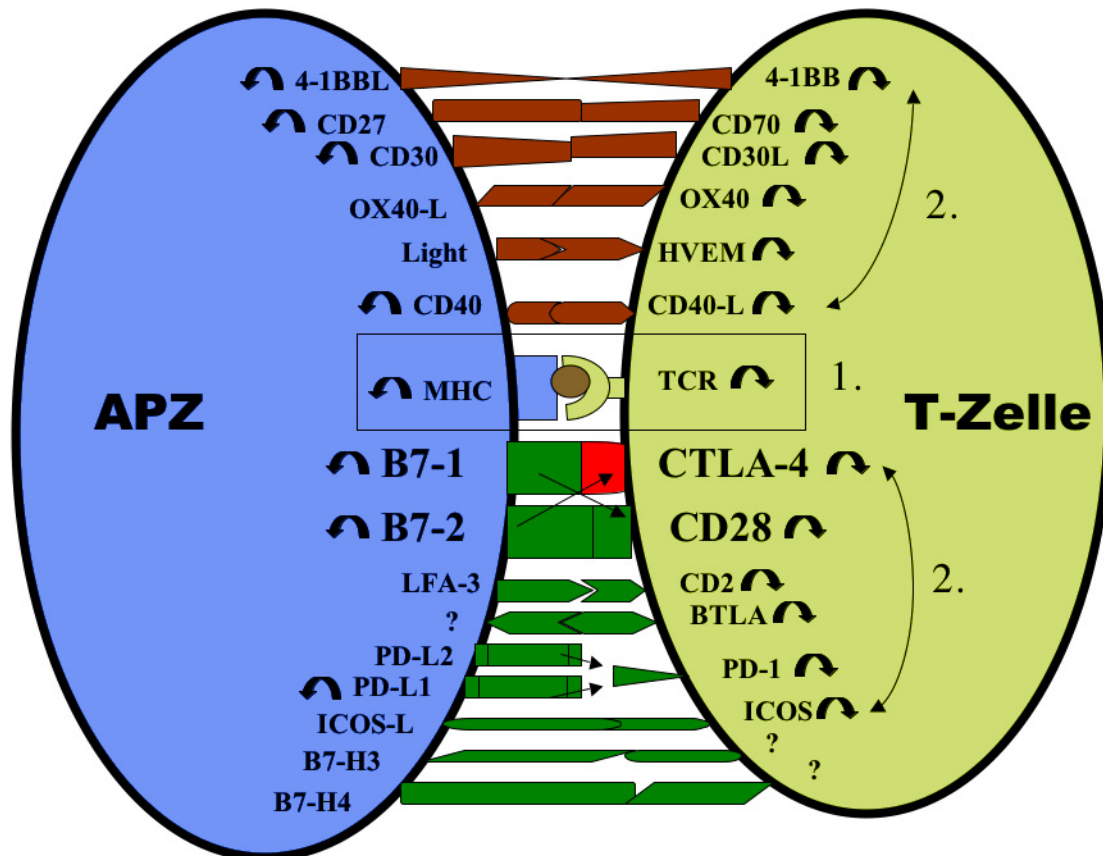


Abb. 1: T-Zellen-APZ Interaktion und die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle.

Spezifische Interaktionen von T-Zellen mit APZ erfolgen im 1. Schritt über TZR Bindung mit einem Peptid:MHC Komplex. Der 2. Schritt ist die Bindung und Signalweiterleitung (↗) durch kostimulatorische Moleküle. Diese lassen sich in 2 große Molekülfamilien einteilen, die Immunoglobulin-Familie und die TNF/TNF-Rezeptorfamilie. Dargestellt sind die wichtigsten Moleküle beider Klassen.

Die kostimulatorischen Moleküle treten als Ligand bzw. Rezeptor auf. Sie brauchen je einen Gegenspieler auf der Zelloberfläche des Interaktionspartners, wobei mehr als ein Ligand oder Rezeptor für ein Molekül existieren kann. Dies ist beispielsweise für die seit langem bekannten Moleküle CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen und ihre beiden möglichen Liganden B7-1 und B7-2 auf der Zelloberfläche der APZ bekannt (Abb.1). Ebenfalls zwei Interaktionspartner, PD-L1 und PD-L2, existieren für das Molekül PD-1 (Abb1.). Der Begriff Kostimulator impliziert, dass es sich um positive, die Aktivierung der Zelle unterstützende Signale handelt. Dies gilt für einige Moleküle wie beispielsweise CD28, OX-40 oder auch 4-1BB, deren Ligation zur Proliferation, Zytokinproduktion und Ausbildung von Effektorzellen führt. Negative Signale, durch beispielsweise CTLA-4 oder auch PD-1, können zu Zellanergie, Apoptose (programmierter Zelltod) oder auch zur Induktion von regulatorischen Zellen führen [54, 58] und sind treffender als Koinhibitoren zu bezeichnen.

1.2.3.1 Retrograde Signalübertragung und alternative Expression für Kostimulatoren

Das als „retrograde Signalübertragung“ bezeichnete Phänomen bedeutet, dass Liganden auch Rezeptoren sein können. Einige ursprünglich als Liganden beschriebene Kostimulatoren zeigen Signalweiterleitung in die den Liganden tragende Zelle.

Signalweiterleitung über B7-1 und B7-2 in der APZ ist vor kurzem entdeckt worden. So steigert Kreuzvernetzung von B7-2 auf CD40 und IL-4 aktivierten B-Zellen die IgG1 Transkription [59]. In dendritischen Zellen kann B7-1 und B7-2 durch CTLA-4 auf CD4⁺CD25⁺ T_{reg} zur Signalübertragung angeregt werden. Diese Signalübertragung führt über die Produktion von IFN- γ zur Induktion des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), welches wiederum Tryptophandegradierung bewirkt. Das fehlende Tryptophan und die entstandenen Tryptophan-Abbauprodukte hemmen die T-Zellproliferation [60, 61]. Dies ist einer der Mechanismen zur Suppression von Effektor-T-Zellen durch T_{reg} Zellen und zeigt die komplexe Interaktion von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zur Aufrechterhaltung der Toleranz.

Die Erkenntnis der retrograden Signalübertragung revolutioniert die Sicht auf die Rezeptor/Ligand Bindungen und deren Signalübertragungswege. Dadurch erstreckt sich die Wirkungsweise von beispielsweise CTLA-4-Ig Behandlung nicht mehr nur auf die Blockade des CD28 Signalweges, sondern auch auf eine mögliche Hemmung der T-Zellproliferation durch Tryptophan-Abbauprodukte ausgelöst durch B7-Signale.

Für die verschiedenen Zelltypen der adaptiven Immunantwort sind spezifische kostimulatorische Moleküle beschrieben. Zunehmend gibt es Studien, welche die Zelllinienspezifität von kostimulatorischen Molekülen widerlegen.

Die auf APZ gut charakterisierten B7 Moleküle wurden in den letzten Jahren auch auf T-Zellen detektiert. So exprimieren T-Zellen in Gehirnen von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) B7-1 und B7-2 Moleküle [62]. In anderen *in vitro* Studien konnte ebenfalls B7-2 auf T-Zellen nachgewiesen werden [63, 64]. Neuere Daten zeigen, dass B7 Moleküle auf T-Zellen Allo-Antworten über T-Zell:T-Zell Interaktion mit CTLA-4 regulieren [65]. Die von T-Zellen exprimierten B7 Moleküle sind hierbei nicht nur Liganden, sondern leiten Signale in die Zellen weiter. Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus B7-1/B7-2^{-/-} Tieren im Vergleich zu B7 kompetenten T-Zellen wesentlich schwerer durch CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen supprimierbar sind. Solche B7 defizienten T-Zellen lösen Organ spezifische inflammatorische Krankheiten wie Dermatitis,

Gastritis und Kolitis in Rag^{-/-} Tieren aus, welche nicht durch CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen verhindert werden können [66]. Der über B7 in T-Zellen ausgelöste Signalweg ist unentdeckt, klar ist, dass STAT-1 und IFN- γ nicht wie in DZ involviert sind [66]. Für CD28 ist wiederum beschrieben, dass es nicht nur auf T-Zellen exprimiert wird, sondern auch auf durch Epstein-Barr-Virus (EBV) aktivierten B-Zellen [67] und Plasmazellen [68, 69] detektiert werden kann.

Ob diese B-Zellexpression auch für das inhibitorische Molekül CTLA-4 gilt, ist unklar.

1.2.3.2 Das Molekül CTLA-4

CTLA-4 (CD152) ist ein 33-37 kDa Transmembran-Protein aus der Immunoglobulin-Familie der Kostimulatoren. Es wird in CD4⁺ und CD8⁺ positiven T-Zellen exprimiert. Die mRNA für CTLA-4 kann bereits in naiven T-Zellen detektiert werden [70], wobei die Expression nach Aktivierung innerhalb weniger Stunden schnell ansteigt [71]. Unter Nutzung einer sensitiven Oberflächenmarkierung für CTLA-4, konnte das CTLA-4 Protein nicht an naiven und nach Aktivierung erst nach 24h auf der Zelloberfläche von T-Zellen detektiert werden [72]. Diese Detektionsmethode zeigt Moleküle, die in einer Dichte von 100-200 pro Zelle exprimiert sind. Kreuzvernetzung von CTLA-4 mit spezifischen Antikörpern zeigt allerdings, dass funktionelles CTLA-4 bereits 4h nach Aktivierung auf zumindest einigen T-Zellen exprimiert werden kann [70]. Der Peak der Oberflächen Expression für CTLA-4 liegt bei 48-72h nach Aktivierung [72, 73]. Intrazellulär ist CTLA-4 24h nach Aktivierung gut sichtbar, kann in intrazellulären Vesikeln gelagert und bis eine Woche nach Aktivierung nachgewiesen werden [72]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CTLA-4, im Gegensatz zu seinem konstitutiv exprimierten Homolog CD28, transient und erst nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert wird [74].

Nach Aktivierung der Zelle kommt es zur Umlagerung von zytoplasmatischem CTLA-4, es wird zur Zelloberfläche in Richtung der T-Zell:APZ Interaktionsstelle polarisiert. Neu translatiertes CTLA-4 Protein kann auch direkt, ohne Speicherung in intrazellulären Endosomen, zur Zelloberfläche gebracht werden, wobei die Stabilisierung für weitere Funktionen Voraussetzung ist [75]. Die Stabilisierung von CTLA-4 auf der Zelloberfläche wird durch das Adapterprotein AP-2 geregelt. AP-2 kann an das Tyrosin-basierte Motiv im zytoplasmatischen Teil des dephosphorylierten CTLA-4 binden, wodurch es zur raschen Endozytose kommt. Liegt das Tyrosin-basierte Motiv phosphoryliert vor, kann AP-2 nicht binden und die Oberflächenexpression von CTLA-4 wird stabilisiert [76, 77].

CTLA-4 zeigt keine intrinsische katalytische Aktivität innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne und Bedarf zur Signalweiterleitung der Assoziation mit anderen Signalmolekülen,

beispielsweise der Src Familie von Tyrosinkinase, SHP-2, PP2a, PI3K und CD3 zeta [78].

CTLA-4 konkurriert mit CD28 um seine Liganden B7-1 und B7-2 auf Antigen präsentierenden Zellen. Es hat eine höhere Bindungsaffinität zu B7-1 und B7-2 als CD28, wobei es dadurch CD28 verdrängen kann [79]. CTLA-4 liegt in der Regel als Dimer vor und kann mit dem ebenfalls als Dimer vorliegenden CD80 komplexe Vernetzungen auf der Zell-Oberfläche bilden [80, 81]. CTLA-4-Kreuzvernetzung führt auf T-Zellen zur Inaktivierung der T-Zellrezeptor-Signaltransduktion, dabei u. a. zur partiellen Inhibition der NFAT Translokation [70], wodurch die Transkription von IL-2 verhindert wird. Dadurch hat CTLA-4 eine begrenzende Wirkung auf die T-Zellproliferation. CTLA-4 verhindert dabei nicht nur generell Zellaktivierung, sondern ist in den Zellzyklus involviert. Es kann durch Runterregulation von Cyclin D3, D4 und D6 die G1 Phase des Zellzyklus verlängern [70, 82]. CTLA-4 kann auch indirekt inhibitorisch wirken, indem es die Expression von TGF- β [83] unterstützt, einem Zytokin, welches die Immunreaktion unterdrückt. Bereits aktivierte Oberflächen CTLA-4⁺ Zellen können nach Restimulation *in vitro* nicht weiter proliferieren [72]. Dies unterstützt die Wichtigkeit von CTLA-4 für die Begrenzung von Immunantworten.

1.2.3.2.1 CTLA-4 als Immunregulator

Die fundamentale Rolle von CTLA-4 für die Begrenzung von Immunantworten zeigt sich in CTLA-4^{-/-} Mäusen, die bereits 3-5 Wochen nach der Geburt an einer lymphoproliferativen Störung sterben. Es kommt zu massiven T-Zellinfiltraten in verschiedene Organe, z.B. Lunge, Leber, Pankreas und Herz, in CTLA-4 defizienten Tieren [84, 85]. T- und B-Zellen aus diesen Mäusen haben einen aktivierten Phänotyp, gekennzeichnet durch die gesteigerte Expression von durch Aktivierung induzierten Molekülen wie CD44, CD25, CD69, und CD86. Zusätzlich sind die Serumtiter von Immunglobulinen in diesen Tieren drastisch erhöht.

CTLA-4 kann auf mehreren Wegen regulatorisch in Immunantworten eingreifen. Neben der zellautonomen Inhibition von T-Zellen gibt es auch Hinweise auf eine nicht zellautonome Regulation [86]. Ein möglicher Mechanismus hierfür sind regulatorische CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen, welche CTLA-4 konstitutiv exprimieren und bei einer Blockade von CTLA-4 mit Antikörpern nicht mehr regulatorisch wirken können [24, 87, 88].

Weitere immunregulatorische Mechanismen bietet CTLA-4 durch das Auftreten verschiedener Genpolymorphismen. Diese Polymorphismen werden oft mit Autoimmunkrankheiten assoziiert, beispielsweise mit Multipler Sklerose, Typ I Diabetes und Basedowscher Krankheit [89, 90]. Ein sehr interessanter Polymorphismus entsteht

durch eine Spleißvariante des CTLA-4 Moleküls, bei der die extrazelluläre Domäne des Moleküls fehlt und somit nicht mit B7 interagieren kann. Diese Ligand unabhängige Variante des CTLA-4 Moleküls ist in regulatorischen Zellen erhöht und scheint in ruhenden T-Zellen die Aktivierung zu verhindern [91]. Ein weiterer Weg, wie CTLA-4 in Immunantworten eingreift, ist der Schutz vor Apoptose durch hohe Oberflächen CTLA-4 Expression in Th2-Zellen [73]. Diese Oberflächen CTLA-4 positiven Zellen überleben am Ende einer Immunantwort und könnten Vorläufer von Gedächtniszellen bilden.

In immunpathologischen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 an der Manifestierung des jeweiligen Krankheitsbildes beteiligt ist. Die Blockade von CTLA-4 durch spezifische Antikörper *in vivo* verstärkt die T-Zellantworten bei Immunisierung mit Antigen und die Parasitenbeseitigung [92, 93]. In dem Mausmodell der EAE verstärkt eine α CTLA-4 Antikörper Administration den Krankheitsausbruch [94]. Eine solche Behandlung während der akuten Phase blockiert teilweise die Remission [95]. Bei einer Gabe von α CTLA-4 Antikörpern in Mäuse ist nicht genau gezeigt, auf welchen Zellen der Antikörper wirkt. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Effektor-T-Zellen, regulatorische T-Zellen oder andere Zelltypen, die CTLA-4 exprimieren können. Dies zeigt, dass CTLA-4 eine wichtige Rolle bei der Remission spielt, unklar bleibt, welche Zellen dabei involviert sind.

1.2.3.2.2 B-Zellen und CTLA-4

In CTLA-4^{-/-} Mäusen zeigen auch die B-Zellen einen aktivierten Phänotyp: B7-2, die Expression von Fas und CD5 sind hochreguliert, und die Antikörperproduktion ist erhöht [84]. Dies könnte auch durch ein Fehlen von CTLA-4 in den B-Zellen bewirkt werden und nicht, wie bisher angenommen, nur durch die dauerhaft aktivierten T-Zellen.

Die Expression von CTLA-4 in B-Zellen wurde erstmals 1995 von der Gruppe um Linsley vorgeschlagen, wobei die experimentelle Umsetzung jahrelang umstritten blieb [96]. Weitere Literatur zu CTLA-4 in B-Zellen deutet die Expression von CTLA-4 auf aktivierten angereicherten B-Zellen an, jedoch wurden die Daten mittels mäßig sensitiver konventioneller Immunfluoreszenz generiert [97]. Die Publikationen widersprechen sich drastisch im Hinblick auf die Stimulationsbedingungen, welche zur Induktion von CTLA-4 führen. Neben diesen Daten gibt es weitere Hinweise zur Expression von CTLA-4 in B-Zell-Lymphomen [98] und in B-Zell-Lymphoblastoiden Zelllinien [99]. Kürzlich wurde CTLA-4 auch auf humanen CD5⁺ B1 B-Zellen beschrieben [100].

CTLA-4 auf B-Zellen könnte B7-Moleküle auf T-Zellen oder auch B7 Moleküle auf APZ binden und dadurch die dem Rezeptor nachgeschaltete Signalkaskade initiieren. Es

bedarf weiterer Untersuchungen zu den genauen Bedingungen der Expression von CTLA-4 in B-Zellen. Weiterhin ist weder die Expression noch die Funktion von CTLA-4 in B-Zellen verstanden, funktionelle Daten *in vivo* fehlen gänzlich.

1.3 Die Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) tritt mit einer Häufigkeit von 1/1000 Einwohnern auf, bevorzugt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und häufiger bei Frauen als bei Männern. Die klinischen Symptome von MS sind sehr unterschiedlich und reichen von Sehstörungen, über Muskelschwäche, Verlust der Blasenkontrolle bis zu Lähmungserscheinungen.

T-Lymphozyten, welche auf körpereigene Antigene reagieren können, sind im Immunrepertoire gesunder Individuen zu finden. So lassen sich beispielsweise T-Lymphozyten-Klone gegen Strukturen aus dem Gehirn, z.B. das Myelin Basic Protein (MBP), [101] das Proteolipid Protein (PLP) [102] und gegen andere körpereigene Antigene, leicht aus dem peripheren Blut gesunder Spender expandieren und klonen. Das Auftreten von Autoimmunkrankheiten wird normalerweise durch regulatorische Mechanismen verhindert. Der Auslöser für MS ist noch nicht eindeutig identifiziert, aber verschiedene mögliche Ursachen sind beschrieben. Zum einen kann ein Ausbruch der Krankheit durch genetische Prädispositionen begünstigt werden. Dazu zählen das Vorliegen bestimmter HLA Allele, z.B. HLA-DRB1 oder HLA-DQB1 oder auch ein Genpolymorphismus im CTLA-4 Gen [103, 104]. Ebenso gibt es mehrere Erkenntnisse, wie es zur initialen Aktivierung von Immunzellen in der Peripherie kommt. Eine ist der Vorgang der „molekularen Mimikry“, bei der T-Zellen mit TZR gegen körpereigene Strukturen (beispielsweise gegen MBP oder PLP) durch Pathogene, die Proteine oder Kohlenhydrate ähnlich den körpereigenen Strukturen exprimieren, aktiviert werden. Eine zweite mögliche Ursache der Immunzellaktivierung ist die Aktivierung peripherer Immunzellen durch ZNS Antigene, welche durch Virusinfektionen, die zur sekundären Gewebsschädigung im Gehirn führen, in die Peripherie gelangen [105]. Der Krankheitsverlauf von MS ist meist durch einen andauernden Wechsel von Rezidiv (Krankheitsschüben) und Remission (Phasen der Linderung) gekennzeichnet. Der individuelle Verlauf der MS kann sehr unterschiedlich sein. Es werden vier verschiedene Verlaufsformen, die Relapsing/Remitting MS, die primär progressive MS, die sekundär progressive MS und als vierte Form die progressive Relapsing MS unterschieden [106].

Histopathologisch zeichnet sich die MS durch die vier Kardinalmerkmale Entzündung, Entmarkung, Axonverlust und Gliose aus. Die Entzündungsherde bleiben auf das Zentralnervensystem (ZNS) beschränkt, treten aber zahlreich und verstreut vor allem in

der weißen Gehirns substanz, den Sehnerven, im Hirnstamm und dem oberen Teil des Rückenmarks auf. Infolge der Entzündung kommt es zum Verlust der für die Signalweiterleitung wichtigen Myelinscheiden von Neuronen. Durch Demyelinisierung des Axons und das entzündliche Milieu treten axonale Transportstörungen, axonale Transektionen und schließlich axonaler Verlust auf [107]. Im späteren Verlauf der MS kommt es zur Sklerose der ursprünglich entzündlichen Herde durch Bildung von Narbengewebe aus Gliazellen. Die für die meisten Symptome der MS verantwortliche Entmarkung der Nervenfasern kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. So wird in primäre immunologisch induzierte Entmarkung mit den Subtypen I (Makrophagen/T-Zell vermittelt) und II (Antikörper/Komplement vermittelt) und zwei weitere Subtypen mit Störungen des Oligodendrozytenstoffwechsels unterschieden [108].

In Nagetieren lässt sich eine der MS sehr ähnliche Erkrankung, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), induzieren und dient als Modellsystem in der immunologischen Forschung [109, 110].

1.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE im Mausmodell empfindet die Krankheitsverläufe der primär immunologischen Entmarkung des Typs I und II nach [108]. Die klinischen Symptome der EAE in der Maus sind Lähmungserscheinungen der Extremitäten, Gewichtsverlust und Blasenschwäche. Zahlreiche Modelle in transgenen und nicht transgenen Mausstämmen lassen eine Induktion von EAE zu. Mit verschiedenen Peptiden der Myelinscheiden und neuronalen Antigenen in isolierter Form oder als Homogenat aus dem Rückenmark kann aktiv eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis induziert werden. Ebenso führt der adoptive Transfer von enzephalitogenen Effektor-T-Zellen zur passiven Induktion einer EAE in verschiedenen Mausmodellen [111, 112]. Die EAE-Modelle unterscheiden sich vornehmlich in ihrer Dauer, Verlauf, Stärke und in der Beteiligung verschiedener Immunzellen. In einigen Modellen verläuft die EAE monophasisch, d.h., dass die Krankheit nach einem Krankheitsschub und einer Remission beendet ist. Die Mausmodelle der EAE mit einem Wechsel an Remission und Rezidiven (R-EAE), wie in SJL/J Mäusen, empfinden am besten den häufigsten Typ der humanen MS nach.

Nach der Induktion einer EAE in Mäusen kommt es zur Aktivierung von beispielsweise PLP spezifischen T-Zellen, welche im normalen Immunrepertoire von SJL/J Tieren zu finden sind [113]. Die EAE ist im weiteren Verlauf gekennzeichnet durch eine Invasion Myelin-spezifischer T-Lymphozyten in das Zentralnervensystem (Gehirn + Rückenmark) und durch die Rekrutierung weiterer Zellen aus der Peripherie, unter anderem

Monozyten/Makrophagen (Abb.2). Nach der Infiltration der Immunzellen ins Gehirn, werden die Lymphozyten lokal reaktiviert, wobei verschiedene Zellpopulationen, die Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch residente Zellen des Zentralnervensystems wie Mikroglia, als APZ fungieren [114] (Abb.2). Die autoreaktiven Zellen, welche EAE induzieren, sind in aller Regel vom Th1 Typ [115], so produzieren sie unter anderem IL-2, TNF- α and IFN- γ . Diese Zytokine sind in enzephalitogenen T-Zellen detektierbar zum Beginn der Krankheit, steigen zum Peak hin an und sind in geringen Mengen während der Remission nachweisbar [116, 117].

Im ZNS kommt es durch die verschiedenen Effektorfunktionen der Immunzellen zur Entmarkung/Demyelinisierung der Nervenfasern, was zur Störung der neuronalen Signalweiterleitung führt [118]. Die Komplexität der beteiligten Immunzellen während einer Immunantwort der EAE/MS ist in Abb.2 dargestellt. Es können CD4⁺, CD8⁺ und B-Zellen mit ihren unterschiedlichen Effektorfunktionen an der Entmarkung/Zerstörung der Neuronen und Schädigung der Mikroglia beteiligt sein. Dies geschieht aber nicht notwendigerweise parallel und nicht jeder Krankheitsverlauf umfasst alle Zellreaktionen.

Die Krankheit MS und EAE im SJL/J Modell sind durch einen Wechsel an Rezidiven und Remissionen gekennzeichnet. Rezidive im Verlauf einer EAE können durch Reaktivität der T-Zellen gegen andere Epitope des gleichen krankheitsinduzierenden Moleküls (intramolekulares spreading) oder aber gegen andere Moleküle (intermolekulares spreading) erfolgen, ein Vorgang der allgemein unter "epitope spreading" zusammengefasst wird [119, 120, 121]. Epitope spreading wird kontrovers diskutiert, so zeigen andere Studien, dass es möglich ist, während des Krankheitsverlaufes Toleranz durch die Gabe des krankheitsinduzierenden Peptides zu erreichen, Reaktionen gegen andere Peptide des gleichen Moleküls bleiben aus [122, 123, 124]. Zu Rezidiven könnte es ebenso durch das Vorhandensein von Gedächtniszellen kommen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt reaktiviert werden, oder auch durch eine gestörte regulatorische Kapazität von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen [105].

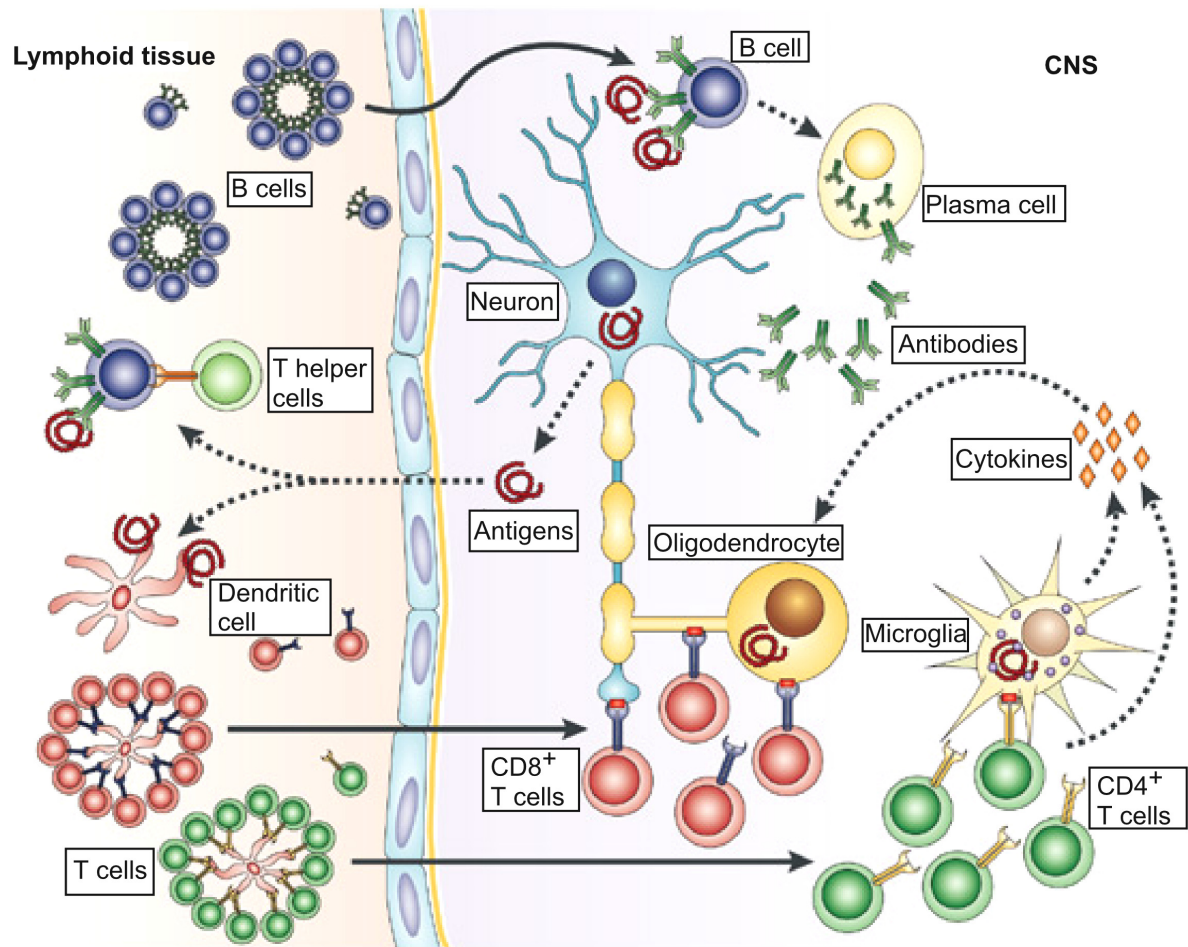


Abb. 2: Komplexität der Immunantwort in MS/EAE

Im Fall des Modellsystems der EAE werden T-Zellen durch Immunisierung der Tiere in der Peripherie aktiviert und wandern in das ZNS ein. In einer MS werden die Immunzellen in der Peripherie durch Antigene aus dem ZNS oder durch Kreuzreaktivitäten gegen körperfremde Antigene aktiviert, nach Expansion wandern sie in das ZNS ein. Treffen die Immunzellen hier ihr Antigen wieder, initiieren die CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen oder auch B-Zellen ihre jeweiligen Effektorfunktionen, was zur Destruktion von Myelinscheiden der Neuronen führt.

verändert aus: „New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis“ Hemmer et al., 2002

1.3.1.1 Mechanismen der Remission – besondere Rolle von regulatorischen T-Zellen

Das Auftreten von Remissionen zeigt, dass auch während einer EAE oder MS Kontrollmechanismen des Immunsystems agieren und zur aktiven Abschaltung der Immunantwort führen.

Der zugrunde liegende Mechanismus der Remission im Verlauf von MS/EAE war bereits in einigen Studien Gegenstand der Untersuchungen. Verschiedene Lösungsansätze in unterschiedlichen Mausmodellen wurden dabei verfolgt. Es wurde der Einfluss des

programmierten Zelltods, immunmodularischer Substanzen und verschiedener Immunzellen während des Verlaufes der EAE untersucht. Außerdem wurde auch die Umschaltung einer inflammatorischen Th1 Zytokinproduktion hin zur Produktion von anti-inflammatorischen Th2 Zytokinen als möglicher Mechanismus der Remission beschrieben. Es wurde postuliert, dass der Prozess der Apoptose maßgeblich die Remission einer EAE reguliert, in dem Moleküle der Bcl Familie und Fas involviert sind [125] [126]. Andere Studien zeigen, dass beispielsweise Erythropoietin (EPO) bei Gabe während der initialen akuten Phase einer EAE den weiteren Verlauf mildert [127]. Des Weiteren wird der Produktion von reaktiven Stickstoffoxid (NO) durch APZ eine Rolle in der Beendigung der Immunreaktion der EAE zugeschrieben, denn dies inhibiert T-Zellproliferation [128]. Th2-Zellen wird eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben daher wurde der Einfluss des Th2 typischen Zytokins IL-4 für die Regulation der EAE untersucht. IL-4 unterstützt die Remission, und Th2-Zellen modulieren den Aktivierungsstatus der Mikroglia, wodurch Th1-Zellen gestoppt werden [129, 130]. Weitere Zelltypen, die an einer Remission beteiligt sein könnten, sind B-Zellen [50], $CD8^+$ T Zellen [131], anti-immunogene TZR $CD4^+$ Zellen [131] und regulatorische T-Zellen [132, 133, 134, 135, 136].

Der Einfluss von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen auf den monophasischen Verlauf einer EAE in C57BL/6 Tieren wurde getestet, indem zusätzlich zum EAE auslösenden Reagenz bzw. enzephalitogenen T-Zellen, T_{reg} Zellen appliziert wurden. Diese Behandlung führte zu einer deutlichen Verminderung der klinischen Symptome einer EAE, aber auf die Remission im speziellen wurde nicht weiter eingegangen [136]. Eine weitere Studie in diesem Mausmodell zeigt, dass Depletion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen zu einer stärker ausgeprägten EAE führt [137]. Weitere Studien zeigen die Möglichkeit, Toleranz durch regulatorische T-Zellen zu induzieren: so führt eine intranasale Gabe von MBP zur Generierung IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen, welche die Proliferation naiver MBP-spezifischer Effektorzellen *in vitro* und *in vivo* inhibieren [138]. Dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen nicht nur den Beginn einer Immunantwort regulieren, sondern auch bereits etablierte Krankheitssymptome mildern, zeigt sich in Studien im autoimmunen Modell der Diabetes [139] oder auch der Kolitis [140].

Die durchgeführten Studien mit regulatorischen Zellen im Modell der EAE beziehen sich zumeist auf die Phase der Induktion und den Schweregrad der klinischen Symptome im monophasischen Krankheitsverlauf. Fragen des Einflusses von regulatorischen Zellen auf primäre und sekundäre Remissionen individueller Mäuse sind ungeklärt.

2 Fragestellung

Die adaptive Immunantwort wird von T- und B-Lymphozyten realisiert. Nachdem der Antigenrezeptor auf T-Zellen durch die Interaktion mit einem MHC-Peptid Komplex auf APZ getriggert wurde, sind kostimulatorische Moleküle ein zweiter Kontrollpunkt für die Immunantworten interagierender Zellen [53, 54, 55]. Ein zentrales kostimulatorisches Molekül, das T-Zellantworten kontrollieren kann, ist das Molekül CTLA-4 [70, 72, 141]. Verschiedene regulatorische T-Zellsubpopulationen exprimieren neben CD25 auch Foxp3 und CTLA-4 [19].

Diverse Mechanismen dienen der Aufrechterhaltung der Toleranz, die durch eine fehlende Immunantwort des Organismus nach Erkennung von „selbst“ gekennzeichnet ist. Zu diesen Mechanismen zählen die Deletion von Zellen während der T- und B-Zellentwicklung, die Deletion von T- und B-Zellen in der Peripherie, T-Zellanergie u. a. durch fehlende Kostimulatoren, sowie die Kontrolle durch regulatorische T-Zellen in der Peripherie. Treten diese Mechanismen außer Kraft, kann es zum Phänomen der Autoimmunität kommen. T- und B-Zellen können sich dann gegen körpereigene Antigene wenden und eine Kaskade an Immunreaktionen auslösen. Für das Abschalten der ungewollten Immunantworten sind wiederum Moleküle der kostimulatorischen Molekülfamilien auf den T- und B-Zellen von außerordentlicher Bedeutung. Autoimmunkrankheiten, wie die Multiple Sklerose, treten oft im Wechsel von Rezidiven (Krankheitsschüben) und Remissionen (Phasen der Linderung) auf. Die Steuerung der Remission ist nicht ausreichend charakterisiert und könnte durch regulatorische Zellen kontrolliert sein. Eine Rolle von CTLA-4 im Verlauf eines Modellsystems für MS, der EAE, wird vermutet, da die Gabe von α CTLA-4 Ak in die Maus zu einer partiellen Inhibition der Remission führt [95]. Welche Zellpopulationen diese Effekte *in vivo* ausführen, ist bisher ungeklärt.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der regulatorischen T-Zellen, gekennzeichnet durch CTLA-4, Foxp3 und CD25, im Verlauf einer EAE durchflusszytometrisch untersucht. Oberflächen CTLA-4⁺ T-Zellen [72, 73] aus dem ZNS während unterschiedlicher Phasen der EAE wurden mit der zytometrischen hochsensitiven Liposomentechnik durchgeführt. Des Weiteren wurde die regulatorische Rolle der T-Zellen aus dem Gehirn der ersten Remission für den Krankheitsverlauf der EAE durch Transfer Experimente untersucht.

Die Rolle der CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen für die Remission wurde durch die Depletion dieser Zellen mit einem monoklonalen α CD25 Ak vor Induktion der EAE analysiert. Zur Ermittlung

der Effektorfunktion der enzephalitogenen T-Zellen aus den $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen depletierten Tieren wurde deren inflammatorische Zytokinproduktion zum Zeitpunkt des ersten Krankheitsschubes und drei Monate nach Auslösung der Krankheit mittels ELISA untersucht. CD4 Zellinfiltrate wurden durch histologische Untersuchung im Gehirn der Tiere dokumentiert.

Die für einige kostimulatorische Moleküle angenommene Zelllinienspezifität wurde in den letzten Jahren revidiert, so ist sowohl die Expression der B7 Moleküle mehrfach auf T-Zellen [62, 63, 64, 65, 66] als auch die Expression von CD28 auf aktivierten B-Zellen und Plasmazellen [67, 68, 69] beschrieben worden. Dieser Linie folgend wurde ebenfalls die Zelllinienspezifität des CTLA-4 Moleküls in Frage gestellt und die Expression dieses Moleküls auf humanen [96] und murinen [97] B-Zellen vermutet. Die Expression von CTLA-4 in B-Zellen wird kontrovers diskutiert. So sind auch die Bedingungen, welche zur Induktion von CTLA-4 in B-Zellen führen, nicht geklärt.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Dissertation wurde die Expression und Rolle von CTLA-4 auf B-Zellen untersucht. Dafür wurden *in vitro* T-Zellen abhängige und unabhängige Stimulationsbedingungen für B-Zellen gewählt. Durch aufwendige Zellanreicherungs- und Zellreinigungsverfahren wurden mittels Reverser Transkriptase PCR mRNA Analysen zur Induktion des Moleküls auf B-Zellen vorgenommen. Oberflächen CTLA-4⁺ B-Zellen wurden mit der zytometrischen hochsensitiven Liposomentechnik analysiert. Die Bedeutung von CTLA-4 für die Funktion der Antikörperproduktion in primären und sekundären Immunantworten wurde *in vivo* verfolgt. Zur Aufklärung der biologischen Rolle von CTLA-4 in B-Zellen *in vivo* wurde die Technologie der Knochenmarkschimären angewandt. In diesem Verfahren wurden Tiere generiert, in denen CTLA-4 spezifisch im B-Zellkompartiment fehlt. Im ELISA wurden nach Induktion einer Thymus abhängigen Immunantwort in den Chimären Antigen spezifische Antikörper der IgM, IgG Subklassen und des IgE-Typs analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gammabestrahlungsanlage, Provit 5200	STS GmbH, Braunschweig
TRIO Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photometer	Shimadzu, Duisburg
Sonicator, Sonoplus	Bandelin elektronik, Berlin
ELISA-Reader: Emax precision microplate reader	Molecular Devices, Ismaning
FACS Calibur	BD Bioscience, USA
FACS Sorter, Diva	BD Bioscience, USA
Blockthermostat	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen

3.1.2 Plastikartikel und Zellkulturgefäße

1,5 ml Reaktionsgefäße	
0,5 ml Reaktionsgefäße	
0,5 ml Thermo-Reaktionsgefäße für PCR	
15 ml PP-Röhrchen	
50 ml PP-Röhrchen	
Zellkulturplatten, rund + flach, verschiedene Größen	
Petrischalen	
96er ELISA Platten: EIA/RIA, Flachboden	
0,2 µM Filter	
Preseparation Filter	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Spritzen, verschiedene Größen	
Filtertips, verschiedene Größen	
Skalpelle	
Zellsiebe, 70 µM	BD Bioscience, USA

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Materialien von folgenden Firmen: Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhäusen), Dynatech (GB) und Braun (Melsungen).

3.1.3 Puffer und Medien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim). Zur Ansetzung der Lösungen wurde durch Milipore™ (Schwalbach) gereinigtes Wasser verwendet.

PBS:	137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 1,5 mM KH ₂ PO ₄ + 7,9 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, pH 7,2
PBS/BSA:	PBS + 30 mM Rinderserumalbumin (BSA)
PBA/BSA/Azid:	PBS/BSA + 0,05% NaN ₃
Fixierlösung:	PBS + 2% Formaldehyd oder PBS + 4% Paraformaldehyd
Saponinpuffer:	PBS/BSA + 0,5% Saponin (Sigma-Aldrich)
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	10 mM KHCO ₃ + 155 mM NH ₄ Cl + 0,1 mM EDTA, pH 7,5
RPMI 1640:	RPMI (PAA, Österreich)
komplett mit:	+ 10% FKS hitzeinaktiviert (Sigma Aldrich, Steinheim) + 100 U/ml Penicillin (PAA, Österreich) + 100 U/ml Streptomycin (PAA, Österreich) + Glutamax-I (2 mM Glutamin, Invitrogen/Life Technologies, USA) + 50 µM 2Mercaptoethanol (Invitrogen/Life Technologies, USA)
RPMI 1640, phenolrotfrei	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM:	(PAA, Österreich)
komplett mit:	+ 10% FCS hitzeinaktiviert (Sigma-Aldrich, Steinheim) + 100 U/ml Penicillin (PAA, Österreich) + 100 U/ml Streptomycin (PAA, Österreich) + Glutamax-I (2 mM Glutamin, Invitrogen/Life Technologies, USA) + 50 µM 2-Mercaptoethanol + 10 nM Natrium-Pyruvat (Biochrom KG, Berlin)
Zell-Einfriermedium:	90% FKS (Sigma-Aldrich, Steinheim) + 10% DMSO (Merck)
PCR Puffer: 10x	(100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3) TibMolBiol, Berlin
TAE Puffer: 1x	(0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 8,0)
Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol
Karbonatpuffer:	0,05 M Na ₂ CO ₃
ELISA Substrat Puffer:	60 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 9,6% Diethanolamine, pH 9,8
DNP + BSA Lsg.:	für ELISA Stlg. 70 mM
PBS/Tween:	0,05% bzw. 0,01%

3.1.4 weitere Chemikalien, Lösungen, Oligomere und Zellkulturzusätze

Sequenzen der Oligomere, die als Primer für die RT-PCR eingesetzt wurden:

β-Aktin Oligomere:	1. 5' Tgg AAT CCT gTg gCA TCC ATg AAA C
	2. 5' TAA AAC gCA CAg TAA CAg TCC g
CTLA-4 (Produkt: 687 bp) Oligomere:	1. 5' AAT gAC TgA ggT CTg TgC CAC g
	2. 5' TTA TgC TgC TTC CAA gTg ATg C
CTLA-4 (Produkt: 387 bp) Oligomere:	1. 5' ACT CTg CTC CCT gAg gAC CTC Ag
	2. 5' ggA Tgg TgA ggT TCA CTC TgC
LAT Oligomere:	1. 5' TCA gAT gAT gCC AAC AgT gTg g
	2. 5' TTC CTC TTC TCC TTC gTC TTC C

Sequenzen der Oligomere, die als Primer für die PCR zur DNA-Typisierung von CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Mäusen eingesetzt wurden:

CTLA-4 Oligomere:	1. 5' Tgg AgT CCT TCA TAg TTA gg
	2. 5' AAC ATC ACA CTC ACC ATC TTg C
neo Oligomere:	1. 5' CAT AgT Tag gTC TgT gAT gC
	2. 5' gCC TTC TAT CgC CTT CTT gAC g

Alle Oligomere wurden in autoklaviertem Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert und wurden von der Firma TibMolBiol in Berlin hergestellt.

DNA mit CpG Motif: TCC ATg ACg TTC CTg ACg TT, (Stlg. 297 µM)

DNA ohne CpG Motif: TCC ATg AgC TTC CTg AgC TT, (Stlg. 180 µM)

Beide DNA wurden von TibMolBiol in Berlin erworben.

Peptide:

PLP₁₃₉₋₁₅₁ Sequenz: HSLGKWLGHDPKF Schneider Mergener, Charité, Berlin

Ova₃₂₃₋₃₃₉ Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR Schneider Mergener, Charité, Berlin

Die Peptide wurden in PBS gelöst und steril filtriert, Ova₃₂₃₋₃₃₉ bei 4°C gelagert und PLP₁₃₉₋₁₅₁ bei -80°C.

Agarose GibcoBRL, Eggenstein

αIg(H+L) Ak, H+L= heavy + light chain Southern Biotech, USA

Alum = Alk(SO₄)₂ x 12H₂O, Aluminiumkaliumsulfat Sigma-Aldrich, Steinheim

Antibiotikum, Baytril 2,5%, Wirkstoff: Enrofloxacin Bayer, Leverkusen

biotinylierte Liposomen, verschiedene Farben DRFZ, Berlin

CFDA-SE Stlg. 5 mM Molecular Probes, USA

Con A Sigma-Aldrich, Steinheim

DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP	TibMolBiol, Berlin
DNP = DNFB Dinitrofluorobenzene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll Histopaque	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	Biochrom KG, Berlin
IFA, Incomplete Freund's adjuvants	Pierce, USA
IL-4 aus Kulturüberständen von Hybridomen, P3X63 Zelllinie, untersch. Stlg.	DRFZ, Berlin
KLH = keyhole limpet hemocyanin	Calbiochem, USA
Latexpartikel	Interfacial Dynamics, USA
Längenstandard für Gelelektroph. 100bp und 1kb Marker	peqlab, Erlangen
LPS von E.coli	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgCl ₂	TibMolBiol, Berlin
Mikropartikel von Miltenyi: α CD4, α CD90, α CD43, α FITC, α CD62L, α CD19	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mycobacterium tuberculosis H37 RA	Difco, USA
PCR Öl = Paraffin, flüssig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	PAA, Österreich
PNPP, p-Nitrophenylphosphat	Southern Biotech, USA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin = SA, in verschiedenen Farben	BD Pharmingen, USA
SA-HRP = Streptavidin-Horseradische Peroxidase	Vector Laboratories, UK
Taq Polymerase	Rapidozym, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziege- α mouse IgG2a, IgG, IgG1, IgM, IgE alle AP (alkaline phosphatase) gekoppelt	Southern Biotech, USA

3.1.5 Mäuse

Es wurden Mäuse des Stammes Balb/c, T-Zell Rezeptor transgene (Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptid erkennende) DO11.10 Balb/c [142] SJL/J, C57BL/6, CTLA-4^{-/-} C57BL/6 [143], B-Zell defiziente μ MT C57BL/6 [144] und MHC transgene HLA-DR1 C57BL/10 (Geschenk von Dr. Röttschke, MDC, Berlin) verwendet. Alle Stämme wurden unter SPF (specific pathogene free) Bedingungen an dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin gehalten und in einem Alter von 3-16 Wochen verwendet.

3.1.6 Antikörper

Die folgenden Antikörper gegen Antigene der Maus wurden verwendet: α CD4 (GK-1.5, DRFZ, Berlin) α Thy-1.2 (HO-13, DRFZ), α CD62L (MEL-14, DRFZ), α CTLA-4 (UC10-4F10, DRFZ), α CD11c (N418, DRFZ), α CD69 (H1.2F3, BD Pharmingen, USA), α CD25 (7D4, BD Pharmingen), α CD3 (145-2C11, DRFZ), α IL-4 (BVD4-1D11, BD Pharmingen), Isotyp für CD25 (R4-22, BD Bioscience), α CD4 (RM4-5, BD Bioscience), α Trinitrophenol (A 19-3, BD Bioscience), α Foxp3 und Isotypkontrolle rIgG2a (FJK-16s, eBioscience San Diego, USA), α Ha-IgG (Jackson Laboratories, USA), α CD25 (PC61), α CD16/CD32 (Fc γ -Block, 2.4G2, DRFZ), α IL-12 (C17-8.6, DRFZ), α IFN- γ (AN18.17.24, DRFZ), α CD40 Ak (3/23, BD Pharmingen), Isotyp für CD40 rIgG2a (54447.11, BD Pharmingen), α CD19 (1D3, BD Pharmingen), α CD86 (GL1, BD Pharmingen), α B220 (RA3.6B2, DRFZ), α CD43 (S7, BD Pharmingen) und α MHC-II (M5/114, DRFZ). Die im DRFZ hergestellten Antikörper kommen aus Hybridomüberständen, wurden über Protein G Säulen gereinigt und in einer HPLC getestet. Für zytometrische Analysen wurden die genannten Antikörper als Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC), Phycoerythrin- (PE), Peridinin Chlorophyll-a Protein- (PerCp) und Cyanin dye 5- (Cy5)-Konjugate verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie (FACS: fluoreszenzaktivierter Zellsorter) erlaubt es, Zellen, die vorher mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten oder mit fluoreszenten Substanzen markiert worden sind, auf Einzelzellebene zu analysieren und zu sortieren. Die markierten Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, welcher durch zwei Laser, einen Argon Laserstrahl (488nm) und einen Diodenlaser (635nm), erfasst wird. Hierdurch werden zum einen Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel von 3°-10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet und korreliert mit der Größe der Zelle. Das im 90° gestreute Licht wird Seitwärtsstreulicht (SSC) genannt und korreliert mit der Granularität der Zelle. Gleichzeitig wird parallel durch vier verschiedene Fotodetektoren gemessen, ob die Zelle mit fluoreszenten Molekülen markiert ist, und aufgrund der Anregung durch den Argonlaser bzw. Diodenlaser Licht emittiert. Für die Messung der Fluoreszenzen standen vier Kanäle FL-1 (530nm), FL-2 (585nm), FL-3 (670) und FL-4 (661nm) zur Verfügung. Die in dieser

Arbeit beschriebenen zytometrischen Messungen wurden mit einem FACS-Calibur™ (BD Bioscience, USA). durchgeführt. Dabei wurden die FSC- und SSC-Signale in linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Es wurden in der Regel zwischen 10.000 und 100.000 lebende bzw. fixierte Zellen im FSC/SSC-Analysefenster aufgenommen und die Auswertung erfolgt mit der Cellquest™ Software (BD Bioscience).

3.2.1.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Zur Markierung von Oberflächenantigenen wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml für 10 min auf Eis in 50 μ l PBS/BSA/Azid mit den gewünschten Antikörperlösungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 20-fachen Volumen an PBS/BSA/Azid gewaschen (300 x g, 8min, 4°C) und in 300-500 μ l PBS/BSA/Azid Lösung zur Messung aufgenommen. Zur Blockade der Fc γ -Rezeptoren auf B-Zellen wurde als erster Schritt in der Markierung ein Fc γ -Block (α CD16/ α CD32 Ak) in 100 μ g/ml eingesetzt. Die vollständige Blockade dieser Rezeptoren wurde im Vorfeld durch Inkubation von unkonjugiertem α CD16/ α CD32 Ak und anschließend α CD16/ α CD32 Ak, FITC gebunden, überprüft. Tote Zellen wurden durch Markierung mit Propidiumiodid (PI) bei der zytometrischen Messung ausgeschlossen.

Oberflächen CTLA-4 Detektion mit der Liposomenmethode:

Die Zellen wurden mit einem α CTLA-4-dig Ak (3 μ g/ml) für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (300 x g, 8min, 4°C) wurden die Zellen mit einem Ak-Konjugat aus 2 Antikörpern (α Dig Ak konjugiert zu α Biotin Ak, 1,5 μ g/ml) für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x gewaschen (300 x g, 8min, 4°C) und dann für 30min bei 4°C mit biotinylierten Liposomen inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschriften wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Spezifität der CTLA-4 Markierung wurde durch Blockade mit einem unkonjugierten CTLA-4 AK in 100fachem Überschuss überprüft.

3.2.1.2 Markierung von intrazellulären Antigenen

Für die Markierung intrazellulärer Antigene wurden 2×10^6 Zellen/ml in PBS durch Zugabe des gleichen Volumens Fixierlösung (2% Formaldehyd) und anschließende Inkubation von 20min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen (300 x g, 8min, 4°C) und in PBS/BSA/Azid bei 4°C aufbewahrt. Die fixierten Zellen wurden zur intrazellulären Markierung einmal mit Saponinpuffer gewaschen, um die Membranen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen für 15-20 min in einer Antikörper-Saponinlösung bei RT inkubiert und mit Saponinpuffer gewaschen (300 x g, 8min, 4°C). Zur Messung wurden die Zellen in PBS/BSA/Azid aufgenommen. Auch bei

intrazellulären Markierungen wurde eine Bindung der Markierungsantikörper an Fc γ -Rezeptoren durch Inkubation der Zellen mit einem α Fc γ -Antikörper verhindert.

Der α CTLA-4 Ak wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt.

Intrazelluläre Foxp3 Markierung:

Die intrazelluläre Foxp3 Markierung wurde nach den Vorschriften des Herstellers eBioscience durchgeführt. Für die Fixierung und Permeabilisierung wurden von der Firma zur Verfügung gestellte Puffer benutzt. Der monoklonale α Foxp3 Antikörper wurde in einer Konzentration von 2 μ g/ml eingesetzt.

3.2.2 Reifung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Femur und Tibia von Balb/c Mäusen der beiden hinteren Extremitäten wurden präpariert. Das Knochenmark wurde mit RPMI-Medium in einer 5 ml Spritze und einer 26G-Nadel aus den Knochen herausgespült. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Zellsuspension mehrfach durch eine 1 ml Pipette gezogen. Nach einem Waschschrift (300 x g, 8min, 4°C) und Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt. Die Kultur der Zellen erfolgt in RPMI Medium (komplett) supplementiert mit 1:10 verdünntem GM-CSF (wurde aus Hybridomüberständen gewonnen und Menge in Vorversuchen bestimmt). Jeden 2. Tag wurde das Medium zur Hälfte gegen frisches Medium mit GM-CSF ausgetauscht. Am Tag 6 wurden die Zellen geerntet und im Versuch eingesetzt.

3.2.3 Zellanreicherung mittels MACS und FACS Technologie

Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet, die Milzen herauspräpariert und unter Verwendung eines 70 μ m Zellsiebes eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Erythrozyten wurden durch Inkubation mit dem Erythrozyten-Lyse-Puffer (7min, 4°C) und einem Waschschrift (300 x g, 8 min, 4°C) oder durch einen Ficoll-Gradienten entfernt. Für letzteres wurden die Zellen in Medium (RT) im Verhältnis 3:1 über die Ficolllösung geschichtet und zentrifugiert (800 x g, 20 min, RT, ohne Bremse). Die mononukleären Zellen befinden sich im Interphasering und wurden vorsichtig entnommen und 2x mit kalter PBS/BSA Lsg. gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C). Zur Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation kamen das magnetische Zelltrennungssystem MACS (Miltenyi Biotec) bzw. fluoreszenzaktiviertes Zelltrennungssystem FACS zur Anwendung. Das System der MACS Zelltrennung beruht auf der Nutzung monoklonaler Antikörper, welche Oberflächenmoleküle auf Immunzellen erkennen, welche an superparamagnetische Mikropartikel gekoppelt sind [145]. Das Zellen-Mikropartikelgemisch wird dann in einer Maschine (AutoMACS) in positive (Zellen + Mikropartikel) bzw. negative (Zellen, an denen

keine Miropartikel gebunden haben) Fraktionen getrennt. Die Reinheit der Separation wurde routinemäßig durch Markierung der Zellen mit farbstoffgekoppelten Antikörpern in der Durchflusszytometrie überprüft. Das Prinzip der Anreicherung mittels FACS wurde bereits unter 3.2.1. beschrieben, wobei die Zellen entsprechend der festgesetzten Analysefenster am FACS-Diva nunmehr in getrennte Reaktionsgefäße aufgenommen wurden.

Anreicherung von B-Zellen mit α CD43 Mikropartikeln:

Die Zellsuspension wurde mit α CD43 Mikropartikeln im Verhältnis 1:5 für 20 min bei 10°C inkubiert. Das Zell-Mikropartikelgemisch wurde einmal in PBS-BSA gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C) und dann ca. 1×10^8 Zellen/ml in PBS-BSA in den AutoMACS (Programm DepleteS) gegeben. Die negative Fraktion enthält die ruhenden B-Zellen in einer Reinheit von ca. 97%.

Anreicherung von B-Zellen mit α CD19 Mikropartikeln:

Die Zellsuspension wurde mit α CD19 Mikropartikeln im Verhältnis 1:10 für 15 min bei 10°C inkubiert. Das Zell-Mikropartikelgemisch wurde einmal in PBS-BSA gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C) und dann ca. 1×10^8 Zellen/ml in PBS-BSA in den AutoMACS (Programm PosselD) gegeben. Die positive Fraktion enthält die B-Zellen in einer Reinheit von ca. 98%.

Anreicherung naiver T-Zellen:

Naive $CD4^+CD62L^+$ T-Lymphozyten wurden aus der Milz von TZR^{tg} DO 11.10. Balb/c Mäuse gewonnen. Die Zellen wurden mit α CD4-FITC markiert (3 μ g/ml) und nach einem Waschschrift (300 x g, 8 min, 4°C) mit α FITC-Multisort Mikropartikeln (1:5) inkubiert (15 min, 10°C). Nach der positiven Anreicherung am AutoMACS und der anschließenden Entfernung der Mikropartikel (mit der Multi Sort Release Lsg., 30 min, 10°C, Programm DepleteS), wurden die $CD4^+$ Zellen mit α CD62L Mikropartikeln (1:25) inkubiert und am AutoMACS mit dem Programm PosselD sortiert. Die $CD4^+$ und $CD62L^+$ angereicherten T-Helfer Zellen hatten eine Reinheit von >98%.

Anreicherung von T-Zellen mit α CD4 Mikropartikeln:

Die Zellsuspension wurde mit α CD4 Mikropartikeln im Verhältnis 1:10 für 15 min bei 10°C inkubiert. Anschließend wurden das Zellen-Mikropartikel-Gemisch einmal in PBS-BSA gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C) und dann ca. 1×10^8 Zellen/ml in PBS-BSA in den AutoMACS (Programm PosselD) gegeben. Die positive Fraktion enthält die $CD4^+$ T-Zellen mit einer Reinheit von > 95%.

Generierung von T-Zelldepletierten Milzzellen:

Die T-Zelldepletierten Milzzellen wurden durch Depletion von CD90⁺ Zellen aus Milzzellen der verschiedenen Mäuse mit Hilfe von α CD90 Mikropartikeln (1:10, 15 min, 10°C) gewonnen. Die Zellen wurden nach einem Waschschrift (300 x g, 8 min, 4°C) im AutoMACS (Programm DepleteS) sortiert. Die Reinheit der negativen Fraktion betrug ca. 98%.

MACS+FACS Anreicherung von B-Zellen aus 24-48h T-Zellkokultur für die Durchflusszytometrie und mRNA Analyse:

Nach 24 bzw. 48h Kultur der Th2-Zellen mit den T-Zelldepletierten Milzzellen wurden die Zellen einmal mit PBS-BSA gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C) und dann für 15 min mit α CD90 Mikropartikeln im Verhältnis 1:10 bei 10°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen jetzt im AutoMACS (Programm DepleteS) sortiert. Die negative Fraktion wurde dann mit α CD19-PE Ak + α CD3-FITC Ak markiert (15 min, 4°C). Nach einem weiterem Waschschrift (300 x g, 8 min, 4°C) wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium am FACS-Sorter (Diva) sortiert. Nach der Anreicherung der Zellen erfolgte ebenfalls eine Reanalyse am FACS-Calibur. Die Reinheit der B-Zellen lag bei 99,9% .

3.2.4 Kultivierung und Stimulation der B- und T-Zellen

3.2.4.1 Zellkultur zur Generierung von Th2-Effektorzellen und anschließende Zellkultur der Th2-Zellen mit T-Zelldepletierten Milzzellen

Zur Aktivierung der naiven T-Helfer Zellen wurden $4,8 \times 10^6$ Zellen/ml in einem T-Zell/APZ Verhältnis von 1:4 in RPMI 1640 angesetzt. Stimuliert (37°C, 5% CO₂) wurden die T-Zellen durch 1 μ g/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid und durch die Zugabe von α IL-12 (6 μ g/ml), α IFN- γ (6 μ g/ml) und IL-4 (30 ng/ml) wurden sie zu Th2-Zellen polarisiert. Am Tag 6 wurden die Th2-Zellen durch einem Ficoll-Gradienten von den restlichen Zellen abgetrennt. Die Reinheit der Th2-Effektorzellen betrug 97-99%. Diese wurden nun erneut mit T-Zelldepletierten Milzzellen unter gleichen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert und die B-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten molekularbiologisch oder durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.4.2 Milzzellkulturen mit dem polyklonalen Stimulator Con A

Die Milzen wurden nach Herstellung einer Einzelzellsuspension in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml RPMI (komplett) mit 3-5 μ g/ml Con A und mit oder ohne 30 ng/ml IL-4 für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert (37°C, 5% CO₂).

Für die Zellkulturen mit T-Zelldepletierten Milzzellen aus CTLA-4^{-/-} C57BL/6 bzw. CTLA-4^{+/+} C57BL/6 mit T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 wurden die Zellen mittels MACS (3.2.3.) entsprechend angereichert. Die jeweiligen T-Zelldepletierten Milzzellen wurden im Verhältnis 4:1 mit den CTLA-4^{+/+} T-Zellen in einer Zelldichte von $4,8 \times 10^6/\text{ml}$ für 48h mit Con A stimuliert. Für die B-Zellmischkulturen wurden T-Zelldepletierte Milzzellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 bzw. CTLA-4^{-/-} C57BL/6 1:1 vereint und im Verhältnis von 4:1 in einer Zelldichte von $4,8 \times 10^6/\text{ml}$ zu T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 Tieren gegeben. Die T-Zelldepletierten Milzzellen aus den CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Mäusen wurden vor der Zugabe zum Zellgemisch mit CFSE markiert und das Zellgemisch mit Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert (37°C, 5% CO₂).

CFSE-Markierung:

Zur Identifizierung der CTLA-4^{-/-} C57BL/6 B-Zellen aus einem Zellgemisch mit CTLA-4^{+/+} C57BL/6 B-Zellen wurden erstere mit CFSE (CFDA-SE) markiert. Die Zugabe von 5 μM CFSE erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS unter RT im Dunkeln für 3 min. Im Anschluss werden die Zellen 2x mit RPMI (komplett) gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C).

3.2.4.3 Zellkultur und Stimulation der angereicherten B-Zellen

Die angereicherten B-Zellen (3.2.3.) wurden in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ Zellen in RPMI Medium mit den unterschiedlichen Zusätzen: LPS (40 μM), CpG (1 μM), αCD40 Latexpartikel und αCD19 Latexpartikel mit oder ohne IL-4 (5 ng/ml) für die entsprechenden Zeiten bei 37°C in 5% CO₂ stimuliert.

Herstellung + Anwendung der αCD40 Latexpartikel:

Es wurden 1ml PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 22 μl Latexpartikel (entspricht 1×10^7 Latexpartikeln) und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αCD40 Ak bzw. Isotyp Ak pipettiert. Diese Lösung 1,5h bei 37°C unter schütteln inkubieren. Anschließend erfolgten 2 Waschschriffe (17900 x g, 4°C, 20 min) mit eiskalter PBS. Danach wurde das Latexpartikel-Ak Gemisch in 1ml RPMI (komplett) mindestens 30 min zur Absättigung möglicher freier Bindungsstellen an den Latexpartikeln inkubiert. Diese αCD40 Latexpartikel werden dann zu gleichen Teilen (5×10^6 Ak gekoppelte Latexpartikel) mit den angereicherten B-Zellen (5×10^6) für die entsprechende Kulturdauer stimuliert.

Herstellung der αCD19 Latexpartikel:

Die Herstellung erfolgt im Prinzip wie für die αCD40 Latexpartikel beschrieben, nur wurden 5 ml PBS + 110 μl Latexpartikel + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αCD19 Ak pipettiert, um in der Zellkulturschale einen Verhältnis von Zellen zu Latexpartikel-Ak Gemisch von 1:10 zu generieren. Das

Gemisch an α CD19 Latexpartikeln (5×10^7 Ak gekoppelte Latexpartikel) wurde zusammen mit den angereicherten B-Zellen (5×10^6) für die entsprechende Kulturdauer stimuliert.

3.2.5 RNA Isolation, cDNA-Herstellung, PCR und Gelelektrophorese

Bei dieser Technik wird die RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre cDNA umgeschrieben und mit dieser cDNA in einer PCR CTLA-4, LAT und β -Aktin amplifiziert. Diese Methode ist nicht quantitativ, sie ermöglicht dennoch eine Aussage über das Vorhandensein einer bestimmten mRNA.

RNA Extraktion: Nach den angegebenen Zellkulturdauern wurden die Zellen 2x gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C), davon das 2. Mal in PBS und im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das trockene Pellet bei -80°C gelagert. Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy MiniKit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte an einem Photometer bei 260nm, wobei die Konzentration der RNA nach der Formel Extinktion von 1 = 40 μ g/ml berechnet wurde.

cDNA Umschreibung: Beim Vorgang der cDNA Umschreibung wird eine komplementäre Kopie der mRNA mit Hilfe eines retroviralen Enzyms, der reversen Transkriptase, erstellt. Die Umschreibung der RNA Proben in cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen und wurde den Angaben des Herstellers folgend ausgeführt.

PCR: Beim Vorgang der PCR wird nach Aufspaltung der DNA in Einzelstränge an diesen ein Komplementärstrang unter Zuhilfenahme der DNA-Polymerase erstellt. Dieser Zyklus wird in der Regel um die 30x wiederholt, bis zahlreiche Kopien einer spezifischen DNA Sequenz produziert wurden.

Für die PCR wurden die cDNA Proben 1:10 vorverdünnt und davon 2 μ l für einen PCR Ansatz von insgesamt 50 μ l eingesetzt. Für die Amplifizierung der verschiedenen cDNA Proben wurde je ein Mastermix angesetzt, zudem nach der Aufteilung jeweils noch 2 μ l der zu bestimmenden cDNA bzw. H₂O pipettiert wurden. Nach Zugabe von 2-3 Tropfen PCR Öl wurden die Proben in den Thermocycler gestellt.

Die Mastermixkonzentrationen und PCR Programme für die verschiedenen Produkte:

1. β -Aktin

Mastermix für 50 μ l:	PCR Programm:	
dNTP 0,4 mM	94°C 4 min	
MgCl ₂	94°C 1 min	
2,5 mM	66°C 1min	28 Zyklen
5 μ l 10x PCR Puffer	72°C 1 min	
200 nM Primer	72°C 10 min	
1 Unit Taq Polymerase	4°C Pause	

Die Mastermixe + PCR Pgr. gelten für alle folgenden PCR, Abweichungen sind notiert:

2. CTLA-4 (387 bp): MgCl₂ 2,0 mM, 35 Zyklen
3. CTLA-4 (687 bp): Annealing 64°C, 72°C 30 sek, 32 Zyklen
4. LAT: MgCl₂ 2,0 mM, Annealing 64°C

Gelelektrophorese:

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Im Agarosegel werden die DNA Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Mitführen eines Längenstandards (DNA-Leiter) ermöglicht eine Größenzuordnung der DNA Fragmente in den Proben. Der Zusatz von Ethidiumbromid ermöglicht eine Detektion der Fragmente als Banden, wenn das Gel mit UV-Licht bestrahlt wird.

Es wurden 1,2-1,8%ige Agarosegele angefertigt, indem die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE Puffer aufgekocht wurde bis die Lösung klar war. Nach einer Abkühlung bis auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (4 μ g/ml) zugesetzt und die Flüssigkeit in eine Gelwanne gegossen. Die Proben (1 μ l Ladepuffer + 20 μ l PCR-Probe) wurden nach dem Festwerden des Gels in die Geltaschen gefüllt und die Elektrophorese lief bei 90-150 Volt entsprechend der Größe der zu erwartenden Banden. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel unter UV-Licht gesetzt und fotografiert.

3.2.6 Zucht, Etablierung der PCR und genetische Typisierung von CTLA-4^{-/-} Tieren

Die Zucht der CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tiere erfolgte im BfR in Marienfelde Berlin unter eigener Aufsicht. Die Verpaarung erfolgte ausschließlich unter CTLA-4^{+/-} C57BL/6 Tieren, denn die CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tiere erreichen die Geschlechtsreife nicht. Die CTLA-4^{+/-} C57BL/6 Tiere zeigen keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu den CTLA-4^{+/+} Tieren [84, 85].

Die CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tiere wurden im Alter von 3-4 Wochen typisiert und für die Experimente eingesetzt, denn sie sterben spätestens im Alter von 5 Wochen.

Die DNA für die Typisierung wurde aus Schwanzbiopsien der Mäuse unter Verwendung eines Genomic DNA-kit II (Invitex, Berlin) nach Herstellerangaben präpariert. Die als Primer dienenden Oligomere (3.1.4.) wurden mit dem Programm GeneJockey II ermittelt und die 4 Primer in einem PCR Ansatz vereint. Die PCR und Agarosegelelektrophorese erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben, Abweichungen: Mastermix für erfolgt mit 4 Primern (2x für CTLA-4, 2x für neo Kasette), 3 mM MgCl₂, 200 ng DNA; PCR Pgr. wie in 3.2.5. für β -Aktin, aber Annealing 62°C und 32 Zyklen.

3.2.7 Induktion einer EAE

SJL/J Mäuse wurden aktiv mit 87µg PLP₁₃₉₋₁₅₁ und 200 µg Mycobakterium tuberculosis in incomplete Freund's adjuvants (IFA) subcutan an drei Stellen, den beiden Flanken und im Nacken, immunisiert. Nach Vermischung von IFA und Mycobakterium tuberculosis wird die Lösung complete Freund's adjuvants (CFA) genannt. Die klinischen Symptome (Krankheitsindex) der EAE wurden wie folgt evaluiert: Krankheitsindex 1: gelähmter Schwanz oder Schwäche der Hinterläufe; Krankheitsindex 2: gelähmter Schwanz und Schwäche der Hinterläufe; Krankheitsindex 3: partielle Lähmung der Hinterläufe; Krankheitsindex 4: komplette Lähmung der Hinterläufe; Krankheitsindex 5: moribund [146]. Es wurden auch Punkte zwischen den Krankheitsindizes von 1-5 verteilt. Ein Krankheitsindex von 0,5 wurde als Remission betrachtet. Für die klinische Evaluierung wurden folgende Parameter herangezogen: 1. *Tag des Krankheitsausbruches (Mittelwert)* ist der Mittelwert der Tage an denen erste Krankheitszeichen innerhalb einer experimentellen Gruppe sichtbar wurden; 2. *Krankheitsfälle* ist die Anzahl der Mäuse die klinische Zeichen einer EAE zu irgendeinem Zeitpunkt des Experimentes innerhalb einer experimentellen Gruppe zeigten; *Mittelwert des Krankheitsindex* ist die Summe aller Krankheitsindizes innerhalb einer experimentellen Gruppe zu einem Zeitpunkt (hier nach 92 Tagen); *Mittlerer Krankheitsindex* ist berechnet als die Summe aller einzelnen Krankheitsindizes geteilt durch die Anzahl der Messungen; *Remission* ist der Abfall der Krankheitsindizes individueller Mäuse von 1-2 Grad für mindestens 2 aufeinanderfolgende Tage; *Rezidiv* ist der Anstieg des Krankheitsindex von mindestens einem Grad über einen Zeitraum von 2 Tagen; *sekundär progressiver Krankheitsverlauf* wurde definiert als ein Krankheitsindex von mindestens 3 über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen. Die Erhebung der klinischen Krankheitsindizes erfolgte blind, das heißt, daß zum Zeitpunkt der Erhebung die experimentellen Gruppen unbekannt waren.

3.2.8 Adoptiver Transfer von inflammatorischen Zellen zur Induktion einer EAE

Zur Induktion einer EAE durch einen adoptiven Transfer wurden enzephalitogene LK-Zellen generiert. Dafür wurden SJL/J Mäuse aktiv mit $87\mu\text{g}$ PLP₁₃₉₋₁₅₁ und $200\mu\text{g}$ Mycobacterium tuberculosis in IFA subcutan an 3 Stellen, den beiden Flanken und im Nacken, immunisiert. Am Tag 10 nach Immunisierung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die drainierenden (inguinal, axillär, brachial) Lymphknoten präpariert. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen 2x in DMEM gewaschen ($300 \times g$, 8 min, 4°C). Diese Zellen wurden im Anschluß in 6er Platten in einer Zelldichte von $6 \times 10^6/\text{ml}$ in DMEM mit $50\mu\text{g/ml}$ PLP₁₃₉₋₁₅₁ bei 37°C in 5% CO_2 stimuliert. 72h nach Kulturbeginn wurden die LK-Zellen 2x gewaschen ($300 \times g$, 8 min, 4°C) und zusammen mit den Lymphozyten aus dem ZNS von Mäusen in Remission im Verhältnis von 3:1 in PBS intra peritoneal in SJL Mäuse injiziert. Die Zellen aus dem ZNS von Mäusen in Remission wurden generiert, indem Mäuse aktiv mit $87\mu\text{g}$ PLP₁₃₉₋₁₅₁ und $200\mu\text{g}$ Mycobacterium tuberculosis in IFA subcutan an 3 Stellen, den beiden Flanken und im Nacken immunisiert wurden und zum Zeitpunkt der frühen Remission (2-4 Tage nach dem Peak der akuten Phase) die im ZNS infiltrierten Lymphozyten angereichert wurden (Siehe 3.2.10.). Da die Tiere nach Immunisierung nicht alle zum gleichen Tag in früher Remission sind, wurden die Lymphozyten aus dem ZNS am jeweiligen Tag präpariert und die Zellen im Anschluß in Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Am Tag des Transfer wurden die Lymphozyten aus dem ZNS aufgetaut, alle Zellen gepoolt und nach 2 Waschschritten ($300 \times g$, 8 min, 4°C) zusammen mit den enzephalitogenen LK Zellen in unbehandelte SJL/J Mäuse injiziert.

3.2.9 Depletion von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen *in vivo*

Die Depletion der $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T_{reg} Zellen erfolgte durch i.p. Injektion von 1 mg αCD25 Ak (PC61) in PBS mit $500\mu\text{l}$ Gesamtvolumen am Tag -5 vor der Induktion einer EAE (3.2.7.) Als Kontrolle diente die Injektion eines rIgG Gemisches in gleicher Konzentration [137, 147]. Die Antikörperpräparationen wurden routinemäßig getestet, um Kontaminationen durch z.B. LPS auszuschließen. Die Depletion der $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T_{reg} Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analysen (3.2.1.1.) 4 Tage nach Injektion des αCD25 Ak getestet. Dafür wurden Blutproben aus der Schwanzvene (3.2.13.) entnommen.

3.2.10 Isolation von Lymphozyten aus dem ZNS

Die Mäuse wurden betäubt und nach Eröffnung des Brusttraumes wurde das Gefäßsystem mit PBS gespült, indem mit einer Kanüle PBS in den linken Ventrikel des Herzens gespritzt wurde (30 ml) und dabei der rechte Ventrikel zum Abfließen des Blutes eröffnet wurde. Das Gehirn und das Rückenmark wurden präpariert, das Gewebe wurde zerkleinert und durch ein 70 µm Sieb gedrückt und im Anschluss 1x in RPMI (300 x g, 8 min, 4°C) gewaschen. Um mononukleäre Zellen zu isolieren wurden die Zellen in einem Percoll-RPMI-Gemisch (40%) resuspendiert und vorsichtig über ein Percoll-RPMI-Gemisch (70%) im Verhältnis 3:1 geschichtet. Nach einer Zentrifugation (800 x g, 30 min, 4 °C, ohne Bremse) wurde der Interphasering mit den mononukleären Zellen abgenommen und 2x in PBS/BSA gewaschen (300 x g, 8 min, 4°C). Im Anschluß erfolgte die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen (3.2.1.). Um genügend Zellen für die zytometrischen Analysen zu generieren, wurden Gehirn und Rückenmark jeweils aus 2-3 Tieren mit gleichem Krankheitsindex und/oder gleicher klinischer Phase gepoolt.

3.2.11 Histologische Markierung von Lymphozyten im Gehirngewebe

Das Gefäßsystem von Mäusen wurde mit Fixierpuffer (4% Paraformaldehyd) (Merck) gespült, bis die Mauskörper erstarrten. Das Gehirn und das Rückenmark wurden präpariert und für 24h im Fixierpuffer belassen. Anschließend wurden die Organe in 5%, gefolgt von 30% Zuckerlösung überführt, bis sie auf den Grund des Röhrchens sanken. Danach wurden die Organe in flüssigem Stickstoff „Schock“ gefroren und bei –80°C gelagert. Frontal Schnitte, mit einer Dicke von 18 µm wurden mit einem Microtom-Kryostat (Leica CM 1900, Bensheim) angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Hämatoxylin/Eosin Gemisch gefärbt. Die CD4 Färbung erfolgte mit einem biotinylierten αCD4 Ak und anschließender SA-HRP (5 µg/ml) Inkubation.

3.2.12 Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen mittels ELISA

Nach zervikaler Dislokation der Mäuse wurde eine Einzelzellsuspension aus Milzen von Mäusen in akuter Phase und in sekundär progressiver Phase bzw. in Remission hergestellt. Nach 2 Waschschritten (300 x g; 4°C; 10 min) in RPMI 1640 wurden die Zellen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ bzw. Ova₃₂₃₋₃₃₉ in den Konzentrationen von 0,2-50 µM oder nur in Medium in einer Zelldichte 2x10⁶/ml bei 37°C in 5% CO₂ stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden 48h nach Beginn der Stimulation entnommen. Bis zur Testung im ELISA verblieben die Zellkulturüberstände bei –80°C im Gefrierschrank. Der ELISA wurde mit dem Kit von R&D Systems (Minneapolis, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.13 Herstellung von Knochenmarkschimären

Gammabestrahlung und Transplantation:

Die C57BL/6 Empfängertiere wurden in einer Gammabestrahlungsanlage mit 10,5 Gray letal bestrahlt. 24h nach der Bestrahlung der Empfängertiere wurden die Knochenmarksspenderzellen aus verschiedenen Tieren gemixt und in 200 µl mit 3×10^6 Zellen in PBS pro Maus i.v. in die Empfängertiere gespritzt:

Folgende Gruppen:

1. 80% µMT C57BL/6 + 20% CTLA-4^{-/-} C57BL/6
2. 80% µMT C57BL/6 + 20% C57BL/6
3. 80% C57BL/6 + 20% CTLA-4^{-/-} C57BL/6

Um Infektionen der Mäuse während der immun-inkompetenten Phase zu verhindern, wurde den Tieren über das Trinkwasser ein Antibiotikum (0,8%) verabreicht. Diese Antibiotika-Gabe startete 1 Woche vor der Bestrahlung und wurde weitere 5 Wochen nach Transplantation durchgeführt.

Gewinnung von Knochenmarkszellen:

Es wurden Femur und Tibia aus beiden hinteren Extremitäten verschiedener Mausstämme präpariert. Das Knochenmark wurde mit RPMI-Medium in einer 5 ml Spritze und einer 26G-Nadel aus den Knochen herausgespült, bis diese weiß und durchsichtig erschienen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Knochenmark mehrfach durch eine 1 ml Pipette gezogen. Es schlossen sich 2 Waschschrte (300 x g, 8 min, 4°C) in PBS/BSA an, bevor die Zellen mit αCD90 magnetischen Mikropartikeln für 15 min bei 10°C inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschschrte (300 x g, 8 min, 4°C) wurden die T-Zellen aus dem Knochenmark unter Nutzung des Programms DepleteS am AutoMACS eliminiert. Eine Analyse der Depletion mittels Durchflußzytometrie (mit αThy1.2-PE und αCD3-FITC, 3.2.1.1.) ergab eine Reinheit der CD90⁺ Knochenmarkszellen von 99%. Um genügend viele Knochenmarkszellen aus den CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tieren zu gewinnen wurden mehrere Knochenmarkspräparationen an verschiedenen Tagen durchgeführt und die Zellen bis zur Transplantation in Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Das Knochenmark aus den C57BL/6 und µMT C57BL/6 Tieren wurde am Tag der Transplantation präpariert und mit den aufgetauten Knochenmarkszellen aus den CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tieren kombiniert.

Kontrolle der Rekonstitution:

Die Kontrolle der erfolgreichen Rekonstitution der chimären Tiere erfolgte 7,5-8 Wochen nach Injektion der Knochenmarksspender Zellen. Dafür wurden die Tiere einige Minuten mit Rotlicht bestrahlt und den Tieren danach 3-4 Tropfen Blut aus der Schwanzvene in ein

Heparin-Medium-Gemisch abgenommen. Die Zellen wurden im Anschluß 1x zentrifugiert (300 x g, 8 min, 4°C) und eine Erythrozyten-Lyse durch eine Inkubation von 1 ml Lyse-Puffer für 7 min auf Eis durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift (300 x g, 8 min, 4°C) mit PBS/BSA erfolgte der Nachweis der Oberflächen Antigene mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.2.1.1.) Zur Überprüfung der letalen Bestrahlung wurden C57BL/6 Empfängertiere nur mit Knochenmark aus B-Zelldefizienten µMT C57BL/6 Tieren transplantiert, diese chimären Tiere hatten nach Analyse in der Durchflusszytometrie keine peripheren B-Zellen, was die letale Bestrahlung bestätigte.

3.2.14 Immunisierung zur Induktion von Antikörperantworten und Serumgewinnung

Acht Wochen nach Transplantation wurden die chimären Tiere mit DNP-KLH (150 µg) in Alum in PBS mit 200 µl i.p. primär immunisiert. Die Sekundärimmunisierung mit 150 µg DNP-KLH erfolgte sieben Wochen nach der primären Immunisierung. Nach den angegebenen Zeiten wurde den Tieren nach Bestrahlung mit Rotlicht aus der Schwanzvene ca. 100 µl Blut abgenommen. Das Blut wurde zentrifugiert (17900 x g, 20 min, RT) und im Anschluß das klare Serum abpipettiert. Nach Wiederholung des Vorgangs wurden die Serumproben bis zur Analyse im ELISA bei -80°C gelagert.

3.2.15 Nachweis der natürlichen Ak und der DNP-spezifischen Ak mittels ELISA mit Seren aus den Knochenmarkschimären

Beim ELISA werden Antigen-Antikörperbindungen durch die Verwendung eines Enzyms (hier alkaline Phosphatase), das ein Substrat (hier p-Nitrophenylphosphat) umsetzt, sichtbar gemacht. Die Enzym-Substrat Reaktion produziert in diesem ELISA eine gelbliche Lösung, deren optische Dichte bei 405nm im ELISA Reader gemessen wird.

Beschichtung der ELISA Platten für natürliche Ak: Die Beschichtung erfolgte mit 1 µg/ml αIg (H+L) in Karbonatpuffer mit 50 µl pro Kavität einer 96er ELISA Platte. Die Platten wurden über Nacht in Folie gewickelt bei 10°C gelagert.

Beschichtung der ELISA Platten für DNP-spezifische Ak: Die Beschichtung erfolgt mit einer DNP-BSA Lösung (50 µg/ml) verdünnt in Karbonatpuffer mit 50 µl pro Kavität einer 96er ELISA Platte. Die Platten werden über Nacht in Folie gewickelt bei 10°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die ELISA Platten 5x in PBS gespült und anschließend die Proben (verdünnt in PBS) in einer 8fach seriellen Verdünnung mit 50 µl pro Kavität aufgetragen. Die Platten mit den Proben wurden 2h bei RT inkubiert und wiederum 5x mit PBS gespült. Jetzt wurden die jeweiligen Ziege-αMaus Antikörper (αIgG, αIgM, αIgG2a, αIgG1, αIgE)

gekoppelt mit alkaliner Phosphatase in verschiedenen Verdünnungen in 0,05% PBS/Tween mit 50 µl pro Kavität aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1h bei RT wurden die Platten 2x in 0,1% PBS/Tween und dann noch 3x in PBS gespült. Nach Auflösung der Substrat (PNPP) Tablette in 5 ml ELISA Puffer (bei 37°C im Wasserbad) wurden 50 µl dieser Lösung pro Kavität aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt im Dunkeln bei RT und dauerte von ca.10 min bis über Nacht (für die DNP-spezifischen IgE Ak). Die Platten wurden im Anschluss bei 405 nm im ELISA Reader analysiert.

Auswertung:

Für jedes Serum wurde eine Verdünnungsreihe (8 Verdünnungen) angefertigt, welche dann auf der x-Achse gegen die gemessenen Extinktionen bei 405 nm aufgetragen wurden. Für jede einzelne ELISA Platte wurde ein geeichtes Serum, das DNP spezifische Ak enthält, und ein Serum aus nicht immunisierten C57BL/6 Tieren (zur Überprüfung der Spezifität) mitgeführt. Das geeichte Serum diente der Erstellung der relativen Titer, indem alle Extinktionskurven der unbekannten Serenproben + des geeichten Serums in einem Diagramm eingezeichnet wurden. Im steilsten Bereich (genauster Messbereich) der Kurven wird eine Gerade gelegt und nun für eine Extinktion die Verdünnungsstufe abgelesen. Jede Verdünnungsstufe der unbekannten Proben wurde durch den abgelesenen Wert für das geeichte Serum geteilt. Der erhaltene Wert gibt den relativen Titer an.

3.2.16 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden unter Zuhilfenahme der Software Statistical Prism (version 3.0cx) durchgeführt. Der Grubbs-Ausreißer Test wurde benutzt, um statistisch vernachlässigbare Daten aus den DNP spezifischen ELISA Daten zu erkennen. Mann-Whitney Test, χ^2 Test und der Students unpaired T-Test wurden für die Analysen von Unterschieden im Krankheitsindex, des sekundär progressivem Krankheitsverlaufs, der FACS Daten und Zytokindaten verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss regulatorischer Zellen auf die Remission und den Krankheitsverlauf von R-EAE

Erkenntnisse über Mechanismen, die den typischen Verlauf von Autoimmunkrankheiten mit Wechseln von Rezidiv (Krankheitsschüben) und Remissionen (Verbesserung der Symptome) beeinflussen, sind für die Behandlung solcher Krankheiten von immenser Bedeutung. Die Rolle regulatorischer T-Zellen für den Prozess der Remissionen einer Autoimmunkrankheit mit Wechsel an Remission und Rezidiv wurde in dieser Arbeit erforscht.

Die Rolle immunregulatorischer T-Zellen während der Remission wurde in einem EAE Modell im Mausstamm SJL/J untersucht, wobei PLP₁₃₉₋₁₅₁ als krankheitsinduzierendes Peptid genutzt wurde [148]. Der in diesen Mäusen auslösbare Verlauf der EAE (Wechsel von Remission und Rezidiv) [109] empfindet am besten den Verlauf der humanen MS nach, in der es zu zahlreichen Remissionen und Rezidiven kommt.

4.1.1 Charakterisierung von T-Zellen mit regulatorischem Potential in verschiedenen Krankheitsphasen einer EAE

4.1.1.1 Foxp3⁺, CTLA-4⁺ und CD25⁺ CD4 T-Zellen im ZNS von Mäusen mit EAE

Zur Erkenntnis der regulatorischen Rolle von T-Zellen während der EAE wurden das Gehirn infiltrierende Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE analysiert. Vergleichend wurden Lymphozyten aus sekundär lymphatischen Organen, wie z.B. der Milz und den LN, analysiert. Zur Identifizierung von regulatorischen T-Zellen wurde die Expression der Moleküle CTLA-4, CD25 und Foxp3 untersucht [19, 24, 27].

Die Induktion einer EAE erfolgte in SJL/J Mäuse durch s.c. Immunisierung mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ in CFA. Das Gehirn infiltrierende Lymphozyten wurden zum Zeitpunkt der akuten Phase und der ersten Remission untersucht. Die akute Phase ist die initiale Phase der EAE, in der ca. 12 Tage nach Immunisierung erste Krankheitszeichen sichtbar werden. Die Beurteilung des Krankheitsindex folgte einem internationalen Standard (3.2.7.). Der akuten Phase folgt eine erste Remission, gekennzeichnet durch einen Abfall des klinischen Krankheitsindex um zwei Grad für mindestens zwei Tage. Immunzellen aus Tieren während des Peaks der akuten Phase, d.h. 2-3 Tage nach dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen einer EAE, wurden analysiert. Zellen aus Mäusen mit einer ersten

Remission wurden 3-5 Tage nach dem Peak der akuten Phase, wenn eine Verbesserung der klinischen Krankheitszeichen festgestellt wurde, entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die das ZNS (Gehirn + Rückenmark) infiltrierenden Lymphozyten wurden mittels eines Percollgradienten von den Gehirn residualen Zellen getrennt (3.2.10.). Die zytometrische Markierung der Zellen erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben, intrazelluläre Markierungen wurden für CTLA-4 und Foxp3 an fixierten Zellen durchgeführt, wobei CD4 und CD25 vor der Fixierung auf lebenden Zellen markiert wurden (3.2.1.1. und 3.2.1.2.). Die Spezifität der Markierung von CD25, Foxp3 und intrazellulärem CTLA-4 wurde jeweils durch den Einsatz von Isotyp-Antikörpern kontrolliert.

Verglichen wurden Zellzusammensetzungen zwischen verschiedenen Organen und Zellen aus der akuten Phase mit denen aus der Remission. Vergleicht man den Prozentsatz $CD4^+$ Zellen im ZNS von Mäusen in akuter Phase und Remission, konnte mit 46% und 41% $CD4^+$ Zellen kein Unterschied festgestellt werden (Abb.3A). Ebenso gab es keinen Unterschied im Prozentsatz $CD4^+$ T-Zellen in der Milz. Ins ZNS infiltrierte $CD4^+$ Zellen, die auch $CD25^+$ waren, unterschieden sich mit 23% zu 21% während der akuten Phase zur Remission gleichfalls nicht (Abb.3B). Signifikant unterschied sich der Prozentsatz $CD4^+CD25^+$ Zellen aber zwischen ZNS und Milz von Mäusen in der akuten Phase (Abb.3B). Die α Kette des IL-2 Rezeptors, auch CD25 genannt, kann sowohl auf T-Zellen mit regulatorischen Funktionen, aber auch auf aktivierten T-Zellen während einer Immunantwort exprimiert werden. Dies könnte bedeuten, dass CD25 in einem Teil der Zellen als Aktivierungsmarker exprimiert wird, denn während der akuten Phase werden die T-Zellen am Entzündungsherd, im ZNS, restimuliert.

Innerhalb der $CD4$ Population im ZNS konnten 40-50% Foxp3 positive Zellen markiert werden, wobei ein signifikanter Unterschied zur Milz aus gleichen Mäusen bestand, in welchen nur 20% aller $CD4^+$ Zellen auch positiv für den Transkriptionsfaktor Foxp3 waren (Abb.3C). Dies zeigt, dass der Anteil regulatorischer Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation am Entzündungsherd höher ist als in der Peripherie. Keinen Unterschied im Prozentsatz $Foxp3^+CD4^+$ Zellen gab es zwischen Lymphozyten aus der akuten Phase gegenüber Lymphozyten aus der Remission (Abb.3C). Zusätzlich konnten wir keinen Unterschied in den Häufigkeiten intrazellulär CTLA-4 exprimierender $CD4^+$ Zellen aus dem ZNS von Mäusen der akuten Phase (mit 41%) und Mäusen in Remission (mit 40%) feststellen (Abb.3D). Die $CD4^+$ Milzzellen aus diesen Mäusen exprimierten zu ca. 10% CTLA-4 intrazellulär. Die Anzahl intrazellulär $CTLA-4^+CD4^+$ Zellen der Milz unterschied sich nicht in Mäusen in akuter Phase oder in Remission (Abb.3D).

Eine detailliertere Analyse der $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ Zellen im Hinblick auf deren Foxp3 and CTLA-4 Expression zeigte, dass letztere Moleküle in beiden ($CD25^+$ und $CD25^-$) Zellpopulationen zu finden sind (Abb.3E). Die gezeigten Daten in Abb.3E sind von Mäusen in erster Remission, wobei ähnliche Daten für Mäuse in akuter Phase gefunden wurden. Innerhalb der $CD4^+CD25^+$ Zellen, welche wir im ZNS detektierten, sind 60% doppel positiv für Foxp3 und CTLA-4 (Abb.3E). Dieser Prozentsatz doppel positiver Zellen für Foxp3 und CTLA-4 unter den $CD4^+CD25^+$ Zellen unterschied sich nicht von den 56% doppel positiven Zellen in der Milz.

Innerhalb der $CD4^+CD25^-$ Zellen fanden wir ca. 30% weniger CTLA-4 und Foxp3 doppel positive Zellen im Vergleich zu den $CD4^+CD25^+$ Zellen (Abb.3E). Interessanterweise gab es 3x mehr $CD4^+CD25^-Foxp3^+CTLA-4^+$ Zellen im ZNS im Vergleich zur Milz (Abb.3E). Diese Daten zeigen erstmals, dass verschiedene regulatorische Zellpopulationen im ZNS von Mäusen zu finden sind. Sie könnten in unterschiedlicher Weise zum Prozess der ersten Remission und dem weiteren Krankheitsverlauf beitragen.

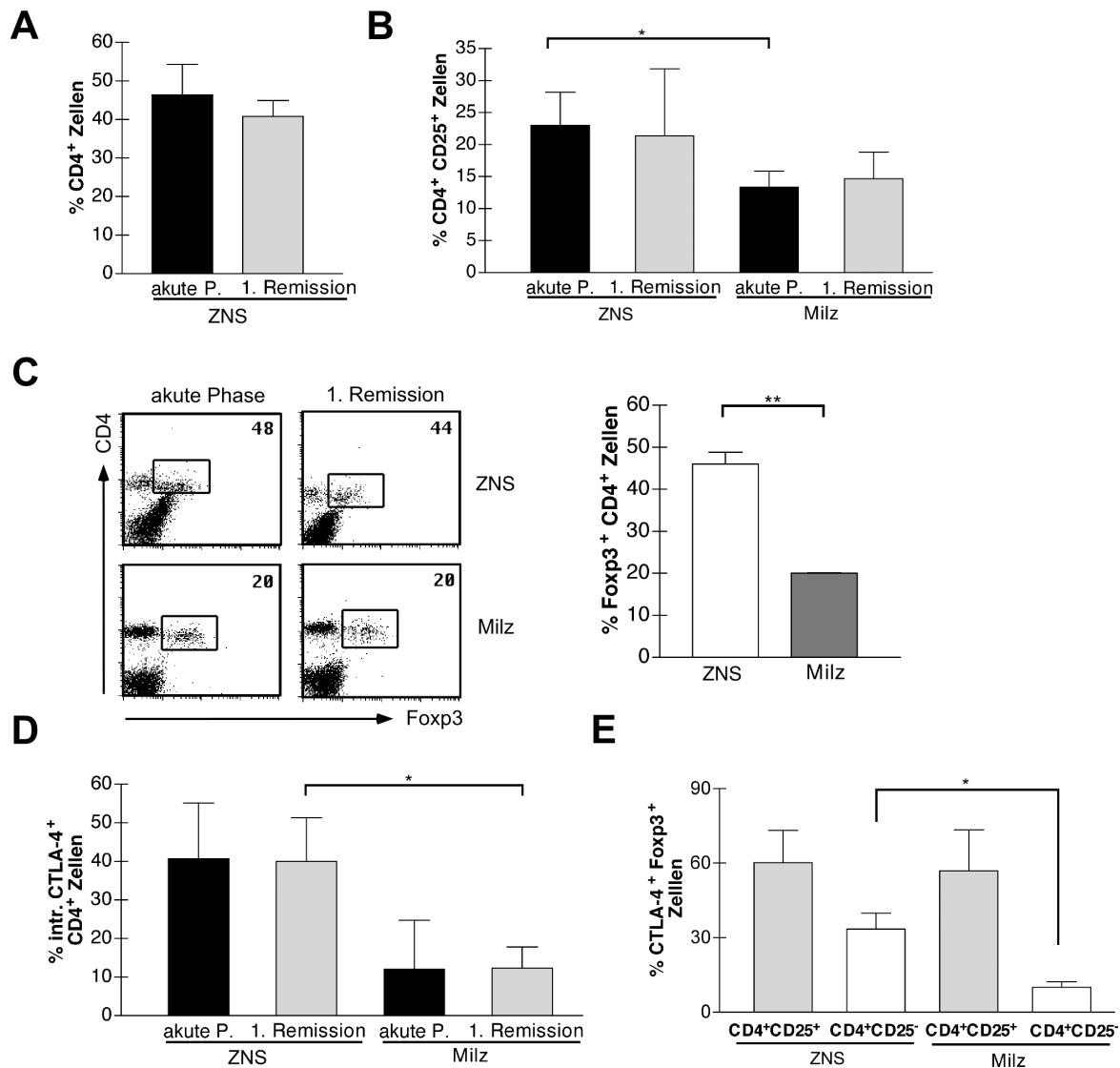


Abb. 3: Regulatorische T-Zellsubpopulationen im Verlauf einer EAE in SJL/J Mäusen. Aktive EAE wurde in SJL/J Mäusen durch s.c. Immunisierung von PLP₁₃₉₋₁₅₁ (87 µg) gelöst in CFA (200 µg) induziert. Zum Zeitpunkt des Peaks der akuten Phase (akute P.: Tag 15-25 p.i.) und während der ersten Remission (3-5 Tage nach dem Peak der akuten Phase), wurden Lymphozyten, die das ZNS infiltrierten, und Lymphozyten aus der Milz analysiert. Für jede Messung wurden Zellen aus 2-3 Tieren vereinigt. **A)** Prozentsatz CD4⁺ Zellen im ZNS. Daten aus fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwert +/- Standardabweichung sind dargestellt. **B)** Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ Zellen im ZNS im Vergleich zur Milz. * P<0,05 Daten aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert +/- Standardabweichung sind dargestellt. **C)** Fixierte Lymphozyten wurden zytometrisch intrazellulär für Foxp3 markiert. Repräsentative Punktdiagramme Foxp3 exprimierender CD4⁺ Zellen aus dem ZNS bzw. der Milz von Mäusen in akuter Phase bzw. der ersten Remission sind dargestellt. Die Zahlen oben rechts innerhalb der Punktdiagramme stehen für Prozent Foxp3⁺CD4⁺ Zellen. Das Säulen-Diagramm zeigt die Zusammenfassung der Daten für das ZNS und die Milz innerhalb der CD4⁺ Population. * P<0,05 Daten repräsentieren Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. **D)** Fixierte Lymphozyten wurden zytometrisch intrazellulär für CTLA-4 markiert. CTLA-4 exprimierende CD4⁺ Zellen aus dem ZNS bzw. der Milz sind dargestellt. * P<0,05 Daten repräsentieren Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. **E)** Der Prozentsatz Foxp3⁺CTLA-4⁺ Zellen unter den CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ Zellpopulationen im ZNS und der Milz von Mäusen in erster Remission sind dargestellt. Foxp3 und CTLA-4 wurden im Anschluss an die zytometrische Oberflächenmarkierung lebender Zellen nach Fixierung intrazellulär markiert. Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. * P<0,05 Messungen aus A-E erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

4.1.1.2 *In vivo* Untersuchung des regulatorischen Potentials von Zellen aus dem Entzündungsherd während der ersten Remission von EAE

Im Folgenden charakterisierten wir die regulatorische Kapazität der unter 4.1.1.1. gefundenen regulatorischen T-Zellsubpopulationen während einer EAE.

Dafür wurden mononukleäre Zellen aus dem ZNS von Mäusen in erster Remission einer aktiv ausgelösten EAE angereichert. Die Zellen wurden zusammen mit enzephalitogenen T-Effektorzellen in SJL/J Mäuse injiziert (3.2.8.). Der Krankheitszustand der Tiere wurde nach einem internationalen Krankheitsindex von 1-5 protokolliert. Wie aus der Literatur bekannt, wurde durch den adoptiven Transfer von *in vitro* mit Peptid spezifisch restimulierten LN-Zellen aus aktiv immunisierten SJL/J Mäusen eine EAE ausgelöst (Abb.4 -△- Kurve). Es kam nicht zu einer Verbesserung der Symptome einer EAE durch die zusätzliche Gabe von Lymphozyten aus der ersten Remission (Abb.4 -▲- Kurve). Dies zeigt, dass die Regulatoren aus der ersten Remission einer EAE die bereits restimulierten enzephalitogenen Th1-Effektorzellen nicht kontrollieren können. Möglicherweise müssen die Regulatoren, um inhibitorisch zu wirken, zusammen mit den Effektorzellen am Entzündungsherd generiert werden.

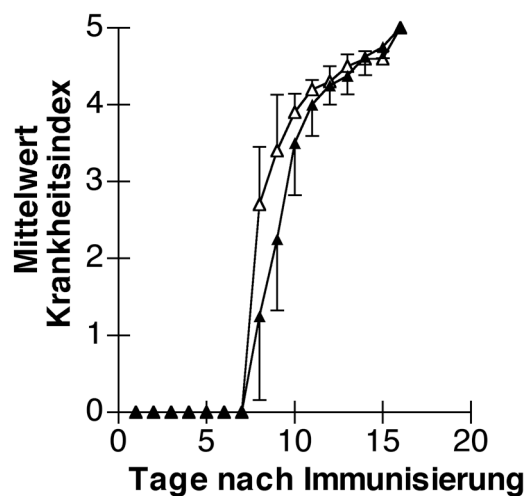


Abb. 4: Zellen aus dem ZNS von Mäusen aus der ersten Remission einer aktiven EAE können eine durch adoptiven Transfer ausgelöste EAE nicht beeinflussen.

Aktive EAE wurde in SJL/J Mäusen durch s.c. Immunisierung von PLP₁₃₉₋₁₅₁ (87 µg) gelöst in CFA (200 µg) induziert. Am Tag 10 n.i. wurden die Zellen aus den drainierenden LK isoliert und für drei Tage mit 50 µg/ml PLP₁₃₉₋₁₅₁ restimuliert. Zusätzlich zu den enzephalitogenen LK Zellen wurden Lymphozyten aus dem ZNS von Mäusen in Remission (-▲-) bzw. keine weiteren Zellen (-△-) i.p. in SJL/J Mäuse injiziert. Die Zahl der injizierten enzephalitogenen LK Zellen war dreimal höher als die der Lymphozyten aus der Remission. Mittelwert des Krankheitsindex setzt sich aus einzelnen Werten von 4-5 Tieren zusammen. Der Krankheitsindex wurde nach einer internationalen Skala von 1-5 festgesetzt. Repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

4.1.1.3 Zahl der Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen ist im ZNS der Mäuse in akuter Phase am höchsten

Wie bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, ist nur die Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche der Zellen funktionell relevant, denn alle Antigen erfahrenen T-Zellen exprimieren CTLA-4 intrazellulär, aber nur der Teil der Zellen, der Oberflächen CTLA-4 exprimiert, kann auf CTLA-4 Signale reagieren [72]. Da nur wenige CTLA-4 Moleküle auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, ist es schwierig CTLA-4 mit konventioneller Fluoreszenz zu detektieren. Um Zellen zu identifizieren, welche CTLA-4 auf der Oberfläche exprimieren, wurde die in unserer Arbeitsgruppe etablierte immunfluoreszente Liposomentechnik genutzt [72, 73]. Diese zytometrische Detektionstechnik erhöht die Sensitivität der Markierung 1000fach.

Durch Nutzung der Liposomentechnik konnten wir Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen aus verschiedenen Phasen einer EAE in unterschiedlichen Organen identifizieren (Abb.5A). Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben einen signifikant höheren Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen im ZNS der akuten Phase mit 15% positiven Zellen gegenüber der Remission, während der nur 4% der CD4 Zellen Oberflächen CTLA-4 exprimierten (3.2.1.1., Abb.5B). In der Milz gab es keinen Unterschied im Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE (Abb.5B).

Eine Analyse der Expression von Oberflächen CTLA-4 auf CD4⁺CD25⁺ Zellen aus der akuten Phase, ergab, dass nur ca. 20% dieser Zellen CTLA-4 auf der Oberfläche tragen (Abb.5C). Dies unterschied sich deutlich von der intrazellulären CTLA-4 Expression dieser Zellen, die 70% CTLA-4 positiv markierte CD4⁺CD25⁺ zeigt (Abb.5C). 50-60% der Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen konnten auch positiv für CD25 markiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Oberflächen CTLA-4⁺ T-Zellen am Entzündungsherd, dem ZNS, zum Zeitpunkt der akuten Phase und der ersten Remission einer EAE detektierbar sind. Der Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen im ZNS ist während der akuten Phase deutlich höher als in der Remission.

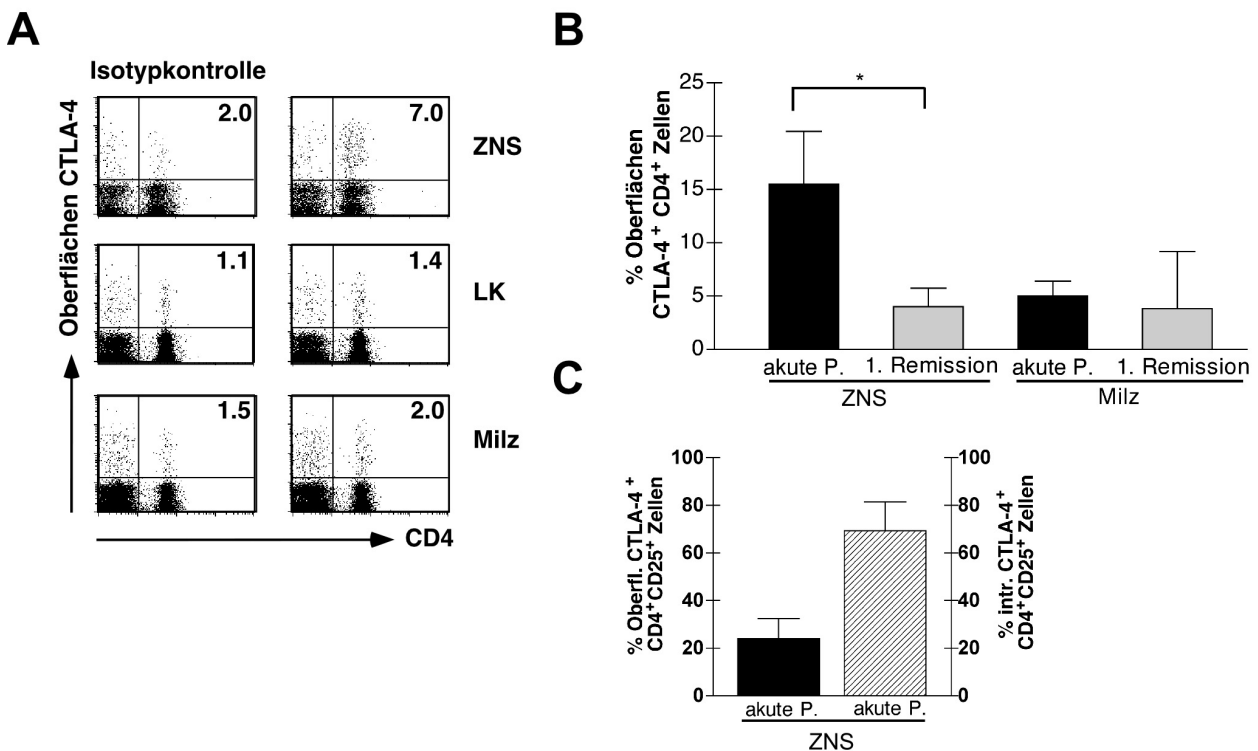


Abb. 5: Oberflächen CTLA-4 auf CD4⁺ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus ZNS und Milz von Mäusen mit EAE. Aktive EAE wurde in SJL/J Mäusen durch s.c. Immunisierung von PLP₁₃₉₋₁₅₁ (87 µg) gelöst in CFA (200 µg) induziert. Zum Zeitpunkt des Peaks der akuten Phase (akute P.: Tag 15-25 p.i.) und während der Remission (3-5 Tage nach dem Peak der akuten Phase) wurden Lymphozyten, die das ZNS infiltrierten, und Lymphozyten aus der Milz analysiert. Für jede Messung wurden Zellen aus 2-3 Tieren vereinigt. Die Markierung von Oberflächen CTLA-4 erfolgte unter Nutzung der Liposomentechnik. Die CTLA-4 Markierung wurde durch Blockade mit einem unkonjugierten CTLA-4 Antikörper kontrolliert. **A)** Repräsentative Punktdiagramme Oberflächen CTLA-4⁺ CD4⁺ Zellen während einer Remission aus ZNS, Milz und LK sind dargestellt. Die Zahlen oben rechts innerhalb der Punktdiagramme stehen für Prozent Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen. **B)** Das Säulendiagramm fasst die Ergebnisse für die Oberflächen CTLA-4 Markierung auf CD4⁺ Zellen aus Milz und ZNS von Mäusen in akuter Phase bzw. Remission zusammen. Daten aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert +/- Standardabweichung sind dargestellt. * P<0.05 **C)** Das Säulendiagramm zeigt Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁺ gegenüber intrazellulär CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁺ Zellen aus dem Gehirn von Mäusen in akuter Phase. Daten aus 2-3 unabhängigen Experimenten als Mittelwert +/- Standardabweichung sind dargestellt. Messungen für A-C erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

4.1.1.4 CD4⁺ T-Zellen im Gehirn von CTLA-4^{-/-} Mäusen

Es ist bereits bekannt, dass es zu massiver T-Zellinfiltration in verschiedene Organe, so z.B. die Lunge, Leber, Pankreas und Herz, in CTLA-4^{-/-} Tieren kommt [84, 85]. Ob es ebenfalls zur Infiltration des immunprivilegierten ZNS kommt, wurde nicht untersucht.

Zur Untersuchung von T-Zellinfiltraten im Gehirn wurden aus 4 Wochen alten CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tieren das Gehirn infiltrierende Lymphozyten isoliert (3.2.10.) und die Zahl CD4⁺ Zellen durch zytometrische Markierung mit einem α CD4 Ak bestimmt. Vergleichend wurde der Prozentsatz CD4⁺ LK-Zellen aus diesen Mäusen betrachtet. Aus Abb.6 geht hervor, dass CD4 T-Zellinfiltrate im Gehirn von CTLA-4^{-/-} Tieren, mit 22% CD4 positiver Zellen, detektierbar waren. In CTLA-4^{+/+} Tieren gleichen Alters konnten keine CD4 Zellen im Gehirn nachgewiesen werden. Der Prozentsatz der CD4⁺ Zellen (63%) in den LK der CTLA-4^{-/-} Tiere ist, wie in der Literatur beschrieben, gegenüber den CD4⁺ Zellen (46%) der LK aus CTLA-4^{+/+} Tiere erhöht (Abb.6).

Es konnten CD4⁺ Zellinfiltrate im ZNS von CTLA-4^{-/-} Tieren nachgewiesen werden.

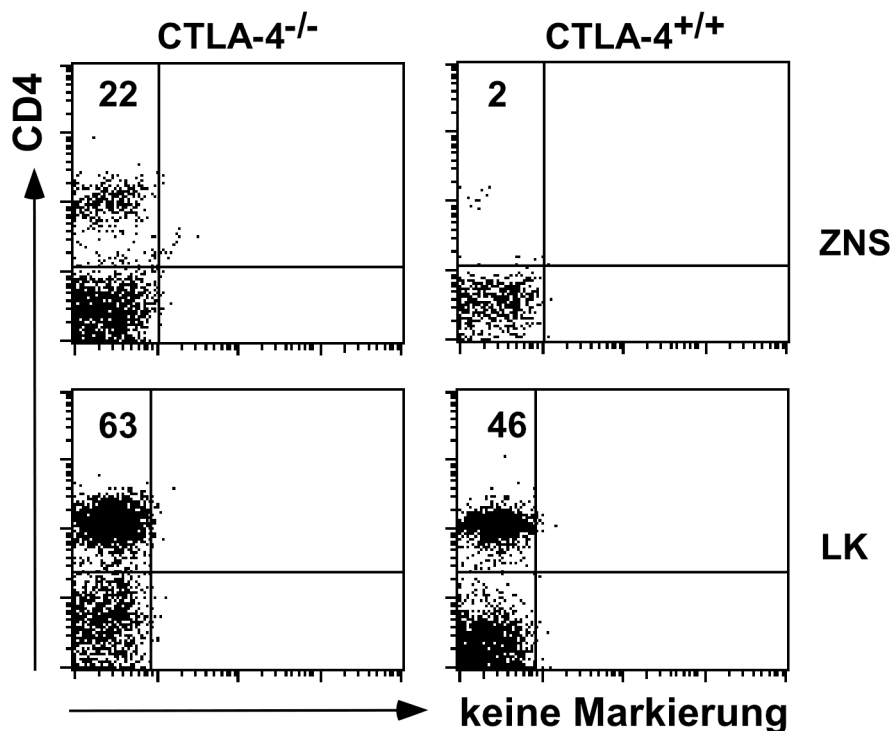


Abb. 6: CTLA-4^{-/-} Mäuse zeigen CD4⁺ T-Zellinfiltrate im ZNS ohne Induktion einer Enzephalomyelitis. Im ZNS infiltrierte Lymphozyten und LK-Zellen aus 4 Wochen alten CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tieren bzw. CTLA-4^{+/+} C57BL/6 Tieren wurden isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit α CD4 Ak zytometrisch markiert. Die Zahlen oben links innerhalb der Punktdiagramme stehen für Prozent CD4⁺ Zellen. Es sind repräsentative Punktdiagramme aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

4.1.2 CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kontrollieren sekundäre aber nicht primäre Remission von EAE

4.1.2.1 Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen vor Krankheitsinduktion verhindert die erste Remission nicht

Um die Funktion der beschriebenen regulatorischen Populationen, den natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen [19, 24, 27], die auch durch weitere Marker, so z.B. CTLA-4, charakterisiert werden, während einer EAE zu verstehen, depletierten wir diese Zellen vor der Induktion einer EAE in SJL/J Mäusen.

Zur Entfernung der CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen wurden SJL/J Tiere mit einer einmaligen Dosis von 1mg α CD25 AK (Klon PC61) pro Tier behandelt [137, 147]. Kontrolltiere erhielten die gleiche Dosis eines rIgG Gemisches (3.2.9). Den Tieren wurde am Tag 4 nach Antikörper-Gabe Blut entnommen bzw. wurden die Tiere getötet zur Entnahme der Milz. In den Einzelzellsuspensionen wurde dann zytometrisch der Prozentsatz CD4⁺CD25⁺ Zellen bestimmt (Abb.7A). Eine deutliche Verminderung der Zahl CD4⁺CD25⁺ Zellen mit 0,5% gegenüber 3,8% in den Kontrolltieren ist nach Depletion mit dem α CD25 Ak zu erkennen. Dies entspricht einer Abnahme um 87%. In den Proben aus der Milz konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme CD4⁺CD25⁺ Zellen nach Depletion beobachtet werden (Abb.7A). Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein anderer α CD25 Ak (Klon 7D4) genutzt als der zur Depletion eingesetzte α CD25 Ak (Klon PC61). Der α CD25 Ak (Klon 7D4) erkennt ein anderes Epitop auf dem CD25 Molekül, das heißt, dass die Markierung von CD4⁺CD25⁺ Zellen mit dem α CD25 Ak (Klon 7D4) unbeeinträchtigt vom eventuell gebundenen α CD25 Ak (Klon PC61) sein sollte.

Abb.7B zeigt, dass die CD25 Markierung mit 7D4 durch einen im Überschuss zugegebenen (200 μ g/ml) PC61 nicht geblockt werden kann. Die CD25 Markierung mit 7D4 kann durch eine Vorinkubation eines unkonjugierten 7D4 mit 100 μ g/ml geblockt werden. Das beweist, dass die CD4⁺CD25⁺ Zellen depletiert sind und nicht der Nachweis durch eine Bindung des α CD25 Ak (Klon PC61) an das gleiche Epitop des CD25 Moleküls gestört ist.

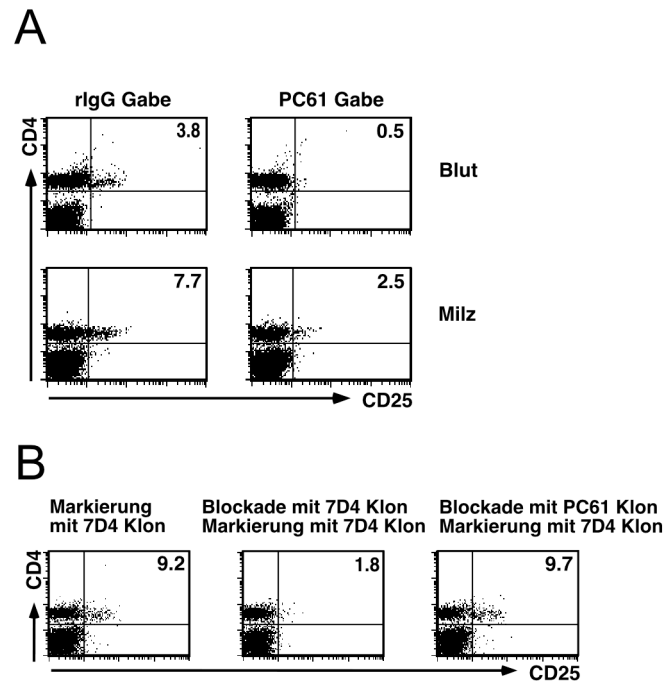


Abb. 7: Depletion von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen in SJL/J Mäusen. **A)** Die Tiere wurden mit einer Gabe eines α CD25 Ak (Klon PC61) (1mg pro Maus) bzw. rIgG (1mg pro Maus) behandelt. 4 Tage nach der Depletion wurden die CD4⁺CD25⁺ Zellen zytometrisch markiert. Die Zahlen oben rechts in den Quadranten zeigen Prozent CD25⁺ CD4⁺ Zellen. Repräsentative Punktdiagramme aus 3 (Milz) bzw. 6 (Blut) unabhängigen Experimenten sind dargestellt. **B)** Prozent CD4⁺CD25⁺ Zellen (Zahl in rechter oberer Ecke) in Milzen unbehandelter SJL/J Mäuse sind gezeigt. Zur zytometrischen Markierung CD25⁺ Zellen wurde ein anderer Klon (7D4) als der zur Depletion (PC61) verwendete Ak eingesetzt. Der im Überschuss zugegebene Klon PC61 (200 μ g/ml) kann die anschließende Markierung mit dem 7D4 Klon nicht blockieren (rechtes Punktdiagramm). Die Markierung ist mit einem unkonj. Ak in (100 μ g/ml) des gleichen Klons (7D4) blockierbar (mittleres Punktdiagramm). Repräsentative Punktdiagramme aus zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Messungen aus A-B erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

Es ist bekannt, dass die CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen im Thymus entstehen [20, 149] und somit nach einer Depletion durch Neusynthese im Thymus die peripheren Organe der Maus repopulieren. Am Tag 21 nach der Depletion der CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen sind ca. 70% der Zellen erneut nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die erzielten Depletionsraten sind ähnlich wie in der Literatur beschrieben [135].

Fünf Tage nach der Depletion der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen in den SJL/J Mäusen wurde in diesen EAE mit $PLP_{139-151}$ in CFA induziert. Der Krankheitsverlauf in den Tieren wurde täglich beurteilt. Die Depletion der Zellen führte zu einem signifikant früherem Beginn erster Krankheitszeichen in den SJL/J Tieren (Abb.8B und Tab.1). Die Zahl der Krankheitsfälle blieb mit 31/33 für die Gruppe, in denen T_{reg} Zellen depletiert wurden, gegenüber 29/32 Krankheitsfällen in der Kontrollgruppe unbeeinflusst (Tab.1). Interessanterweise zeigten alle Tiere aus beiden experimentellen Gruppen eine erste vollständige Remission (Abb.8A/B und Tab.1). Dies zeigt, dass die erste Remission unabhängig von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen ist.

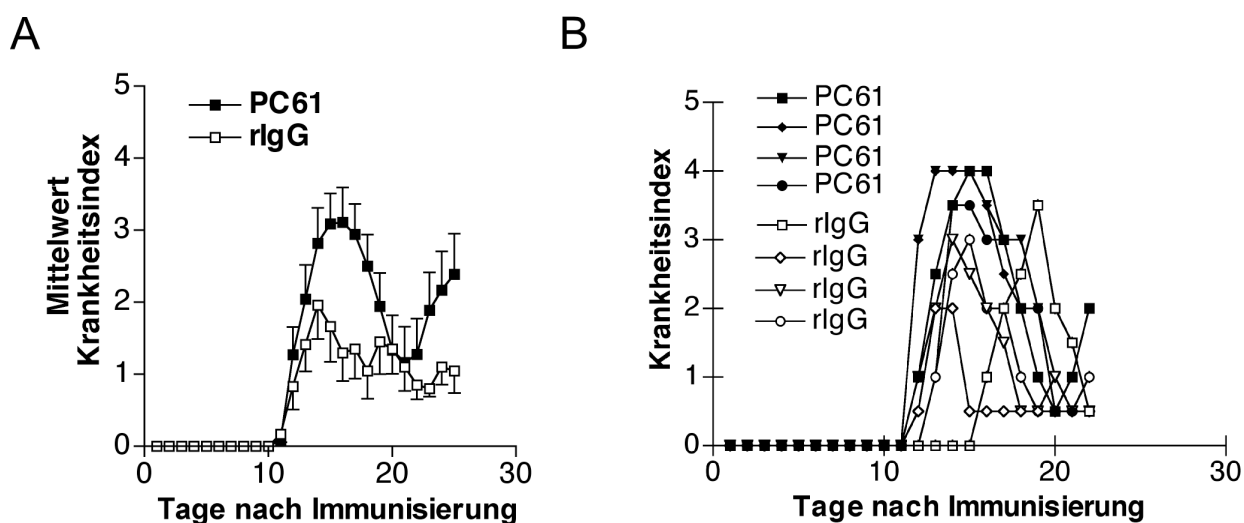


Abb. 8: Erste Remission ist unabhängig von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen von SJL/J Mäusen wurden durch die Gabe von 1mg PC61 i.p. am Tag -5 depletiert. EAE wurde induziert mit $PLP_{139-151}$ (87 μ g) in CFA (200 μ g) s.c. am Tag 0. Der Krankheitsindex wurde nach einer internationalen Skala von 1-5 festgesetzt und ist für die Tage 0-25 aufgetragen. **A**) Mittelwert des Krankheitsindex setzt sich aus einzelnen Werten von 11 (rIgG Gruppe) und 12 Tieren (PC61) zusammen. **B**) Der Krankheitsindex von je 4 repräsentativen Mäusen (aus 6A) von jeder Gruppe (depletiert: PC61; nicht depletiert: rIgG) sind dargestellt. Es sind die Krankheitsverläufe während der akuten Phase und der ersten Remission dargestellt. A) und B) Eines von drei repräsentativen Experimenten ist gezeigt. Messung erfolgte durch Beurteilung des Krankheitszustandes (3.2.7.).

Tab. 1: Effekt der Depletion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen auf den frühen klinischen Verlauf der EAE

Experimentelle Gruppe	Tag des Krankheitsausbruchs (Mittelwert)	Krankheitsfälle	1. Remission
PC61 ^{a)}	13.0 \pm 0.334 ^{b)}	31/33	29/29
rIgG ^{a)}	18.5 \pm 2.015	29/32	27/27

a) Zusammenfassung von 3 Experimenten, Mittelwert \pm SEM gezeigt

b) t-test $p < 0.01$

4.1.2.2 CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zelldepletion in SJL/J Mäusen führt zu sekundär progressivem Krankheitsverlauf mit verminderten Remissionen und CD4-Zellinfiltraten im ZNS

Die frühe Phase der EAE, bis ca. Tag 25, blieb in Bezug auf das klinische Krankheitsbild und die erste Remission von der T_{reg} Zelldepletion unbeeinflusst. Das EAE Modell in SJL/J Mäusen zeichnet sich aber gerade durch die lange Dauer der EAE mit zahlreichen Rezidiven (Krankheitsschüben) und darauf folgenden Remissionen bis zu drei Monaten aus. Wir beobachteten den Krankheitsverlauf der Tiere über einen Zeitraum von drei Monaten. Nach CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zelldepletion konnte ein hoch signifikanter Unterschied ($P < 0,0001$) im Mittelwert des Krankheitsindex festgestellt werden zwischen Tieren, deren T_{reg} Zellen depletiert waren (PC61 Gruppe), und Tieren, denen rIgG gespritzt wurde (Abb.9A). Zusätzlich war ein signifikant ($P < 0,01$) höherer Mittlerer Krankheitsindex (3.2.7.) in den depletierten Tieren über den Zeitraum der Beobachtung von 92 Tagen festzustellen (Tab.2). Obwohl die erste Remission in den Tieren, in denen CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen depletiert wurden, unverändert blieb, wurde ein großer Einfluss dieser Zellen auf sekundäre Remissionen ermittelt. Es gab eine signifikant höhere Zahl von 42% Tieren in der PC61 Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (rIgG), die eine sekundär progressive Verlaufsform zeigten (Krankheitsindex von mindestens 3 über einen Zeitraum von 30 Tagen) (Abb.9C). In Abbildung 9A ist der Krankheitsverlauf als Mittelwert des Krankheitsindex aus allen am Experiment beteiligten Tieren gezeigt. Eine detaillierte Darstellung ist in Abb.9B zu finden, in der jeweils 4 Krankheitsverläufe von repräsentativen Tieren aus den beiden experimentellen Gruppen gezeigt werden. Die Mäuse aus der rIgG Gruppe zeigen einen Krankheitsverlauf mit einem Wechsel von Remission und Rezidiv von Tag 30 an, wobei Tiere aus der PC61 behandelten Gruppe keine Remission zeigen, sondern einem sekundär progressiven Verlauf folgen (Abb.9B und Tab.2). Zum Zeitpunkt 92 Tage nach Immunisierung gab es einige Tiere in der rIgG Gruppe, die ein Rezidiv (Krankheitsschub) erlebten. Dies begründet den Mittelwert des Krankheitsindex von 2 in der rIgG Gruppe am Ende des Beobachtungszeitraums (Abb.9A).

Zusammenfassend folgten 3x mehr Tiere aus der T_{reg} Zellen depletierten Gruppe einem sekundär progressivem Krankheitsverlauf.

Ein weiteres Charakterisierungsmerkmal eines sekundär progressiven Verlaufs der EAE sind $CD4^+$ Zellinfiltrate im ZNS [150, 151]. In das ZNS infiltrierende Lymphozyten wurden durch Immunfluoreszenz mit einem $\alpha CD4$ Ak sichtbar gemacht, wobei eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin/Eosin genutzt wurde (3.2.11., Abb.9D). Hämatoxylin färbt dabei die Zellkerne blau, und durch Eosin in rot kann das Zytoplasma sichtbar gemacht werden. Es konnten keine $CD4$ Zellinfiltrate in Gehirnschnitten von Tieren der rIgG Gruppe, die sich in Remission befanden, am Tag 92 nach Immunisierung festgestellt werden. In der von T_{reg} Zellen depletierten PC61 Gruppe konnten am Tag 92 nach Immunisierung $CD4^+$ T Zellen (braune Färbung) im perivaskulären Raum und dem angrenzenden Parenchym detektiert werden. Diese Daten implizieren, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen einen Langzeit inflammatorischen Prozess während einer EAE im ZNS verhindern bzw. vermindern.

Tab. 2: Depletion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen verändert den späten klinischen Verlauf der EAE

Experimentelle Gruppe	Mittelwert Krankheitsindex	EAE induzierte Sterberate	Sekundär progressiver Verlauf
PC61 ^{a)}	$1.919 \pm 0.227^b)$	4/31	12/29 ^{c)}
rIgG ^{a)}	1.143 ± 0.134	2/29	3/27

a) Zusammenfassung von 3 Experimenten, Mittelwert \pm SEM gezeigt

b) t-test $p < 0.01$

c) χ^2 $p < 0.05$

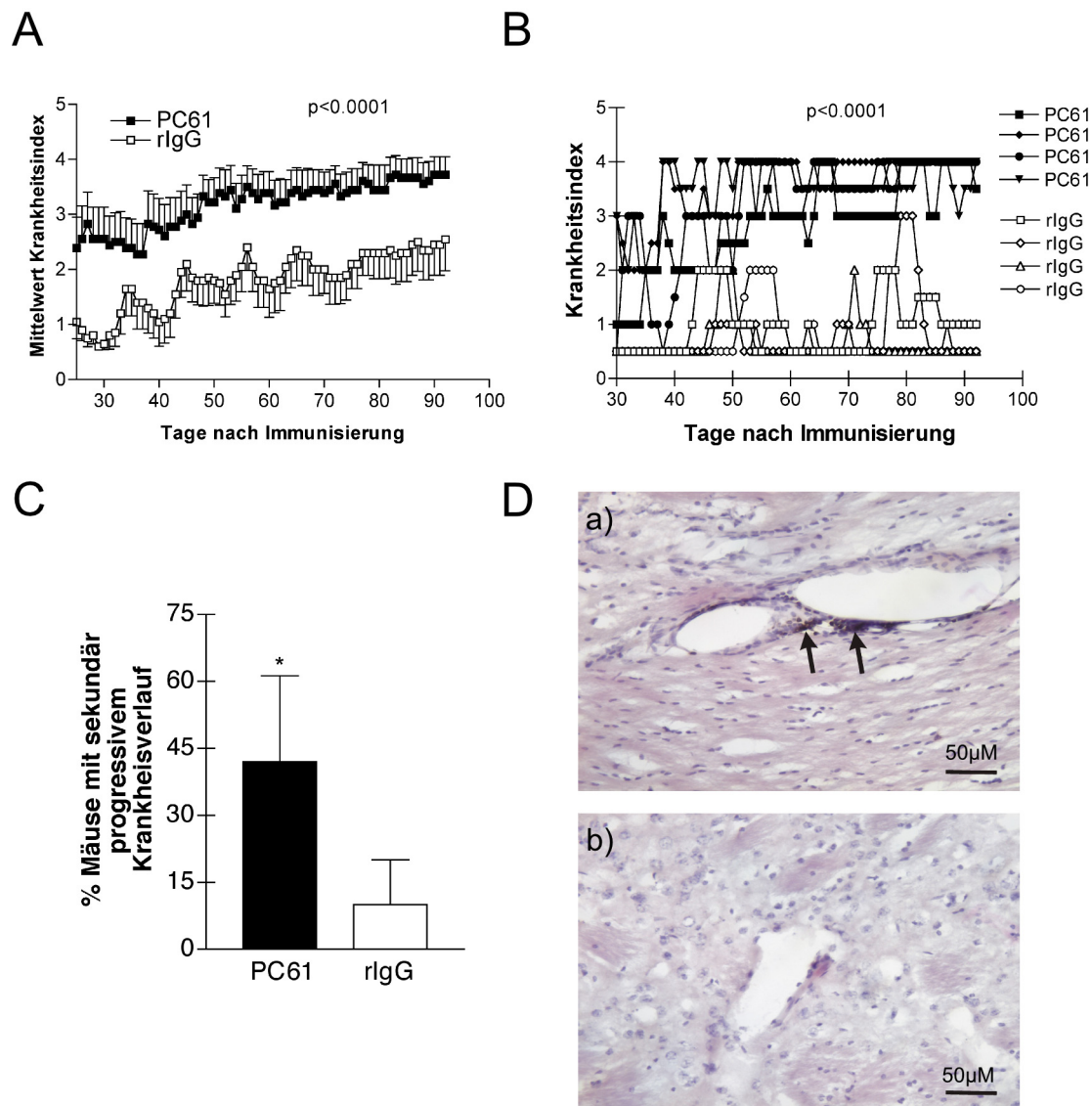


Abb. 9: Sekundär progressiver Krankheitsverlauf von Mäusen, denen $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen depletiert wurden. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen von SJL/J Mäusen wurden durch die Gabe von 1mg PC61 i.p. am Tag -5 depletiert. EAE wurde induziert mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ (87 µg) in CFA (200 µg) s.c. am Tag 0. **A**) Mittelwert des Krankheitsindex setzt sich aus einzelnen Werten von 11 (rIgG Gruppe) und 12 Tieren (PC61 Gruppe) zusammen. Der Krankheitsindex wurde nach einer internationalen Skala von 1-5 festgesetzt. Es ist eine Periode von 62 Tagen, beginnend am Tag 30 nach Immunisierung, dargestellt. Messung durch Beurteilung des Krankheitszustandes nach internationalem Standard. **B**) Der Krankheitsindex von je vier repräsentativen Mäusen (aus 9A) aus jeder Gruppe (depletiert: PC61; nicht depletiert: rIgG) sind dargestellt. Es ist eine Periode von 62 Tagen, beginnend am Tag 30 nach Immunisierung, dargestellt. **C**) Prozent der Mäuse mit sekundär progressivem Krankheitsverlauf nach Depletion (PC61) bzw. ohne Depletion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen (rIgG) als Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$ **D**) Histologische Schnitte aus Hämatoxylin/Eosin gefärbten Gehirnen von Mäusen mit sekundär progressiver Verlaufsform (PC61 Gruppe) **a**) bzw. in Remission (rIgG Gruppe) **b**) Lymphozyten, welche das Gehirn über ein Blutgefäß infiltrierten, wurden mit $\alpha CD4$ Ak sichtbar gemacht (braune Färbung). Repräsentative Bilder aus einem von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Maßeinheit = 50 µm. Histologische Immunfluoreszenz.

4.1.2.3 Sekundär progressive Verlaufsform nach CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zelldepletion wird bereits während der akuten Phase der EAE eingeleitet

Bedeutende Aspekte von Immunantworten sind die Produktion und Verfügbarkeit von Zytokinen. Zytokine interagieren als lösliche Mediatoren zwischen Zellen und Geweben. Zur Analyse der Antigen spezifischen proinflammatorischen Zytokinproduktion wurden Milzzellen aus Mäusen in akuter Phase der EAE sowie Milzzellen von Mäusen am Tag 92 nach Immunisierung isoliert (3.2.12.). Die Mäuse am Tag 92 nach Immunisierung befanden sich in sekundär progressiver Verlaufsform (PC61 Gruppe) bzw. in Remission (rlgG Gruppe). Die Milzzellen wurden *in vitro* mit dem krankheitsinduzierenden Peptid PLP₁₃₉₋₁₅₁ bzw. einem krankheitsirrelevanten Peptid, dem Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉ (OVA), restimuliert. Mäuse mit gleichem Krankheitsindex wurden für die Zytokinanalysen aus der PC61 und der rlgG Gruppe während der akuten Phase der EAE ausgewählt. Am Tag 92 hatten Mäuse für die Zytokininanalyse aus der PC61 Gruppe einen Krankheitsindex von 3-4 (seit mindestens 30 Tagen) und Mäuse aus der rlgG Gruppe zeigten keine äußerlichen Krankheitszeichen. Alle Mäuse, aus denen die Zytokinproduktion der Milzzellen am Tag 92 untersucht wurde, hatten im Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der akuten Phase mindestens einen Krankheitsindex von 4.

Milzzellen aus der PC61 Gruppe während der akuten Phase (Tag 15-25 nach Immunisierung) produzierten mit 195,5±6,36 pg/ml signifikant höhere TNF- α Level als die Milzzellen aus den Kontrolltieren mit 128±1,41 pg/ml TNF- α , wenn diese mit 50 μ g/ml PLP₁₃₉₋₁₅₁ stimuliert wurden (Abb.10). Die TNF- α Produktion war Antigendosis abhängig und höhere Zytokinlevel in Milzzellkulturen aus der PC61 Gruppe gegenüber der rlgG Gruppe konnten in allen getesteten Zellkulturüberständen verschiedener Antigendosen (0,2-50 μ g/ml) detektiert werden (Abb.10). Am Tag 92 nach Immunisierung konnte kein Unterschied in der TNF- α Produktion zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb.11).

Während der akuten Phase der EAE konnten achtmal höhere IFN- γ Level in den Kulturüberständen der Milzzellen aus der PC61 Gruppe mit 1310±208 pg/ml IFN- γ gegenüber 153,5±10,6 pg/ml IFN- γ aus den Milzzellkulturen der rlgG Gruppe bei einer Stimulation mit 50 μ g/ml PLP₁₃₉₋₁₅₁ detektiert werden (Abb.10). Ebenfalls unterschied sich die IFN- γ Produktion der Milzzellen der PC61 Gruppe signifikant von denen der Milzzellen der rlgG Gruppe in allen getesteten Konzentrationen an PLP₁₃₉₋₁₅₁ (0,2-50 μ g/ml) Peptid (Abb.10).

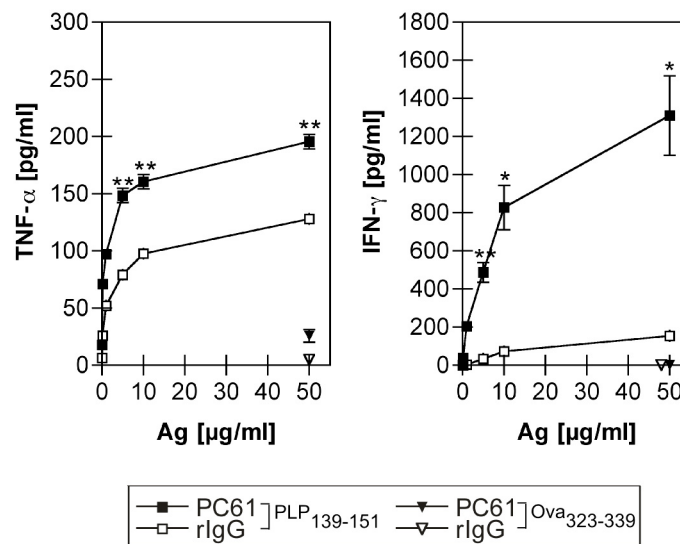


Abb. 10: Erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine während der akuten Phase der EAE. CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen von SJL/J Mäusen wurden durch die Gabe von 1mg PC61 i.p. am Tag -5 depletiert. EAE wurde induziert mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ (87 μg) in CFA (200 μg) s.c. am Tag 0. Während der akuten Phase der EAE (Tag 15-25 nach Immunisierung) wurden Milzzellen von Tieren mit gleichem klinischen Krankheitsindex aus der T_{reg} depletierten (PC61) bzw. nicht depletierten Gruppe (rIgG) isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* mit dem enzephalitogenen Peptid PLP₁₃₉₋₁₅₁ in Konzentrationen von 0,2; 1; 5; 10 und 50 μg/ml (■ und ▼) und einem irrelevanten Peptid Ova₃₂₃₋₃₃₉ mit 50 μg/ml (□ und ▽) restimuliert. TNF-α and IFN-γ Produktion in pg/ml in Abhängigkeit von der Konzentration des Antigens sind gezeigt. Repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. * P<0,05; ** P<0,01 Messung erfolgte mittels ELISA.

Am Tag 92 konnte eine signifikant höhere IFN-γ Produktion in Zellkulturüberständen von Milzzellen aus der sich in sekundär progressiver Verlaufsform befindlichen PC61 Gruppe mit 311,2±61,1 pg/ml IFN-γ gegenüber 87,7±1,84 pg/ml IFN-γ in Überständen von Milzzellen aus der rIgG Gruppe in Remission im ELISA nachgewiesen werden (Abb.11). Die IL-2 Produktion von mit 50 μg/ml PLP₁₃₉₋₁₅₁ restimulierten Milzzellen war ebenfalls in der PC61 Gruppe (CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen depletiert) mit 878±122,8 pg/ml IL-2 gegenüber 557±68,3 pg/ml IL-2 aus der rIgG Gruppe signifikant erhöht (Abb.11).

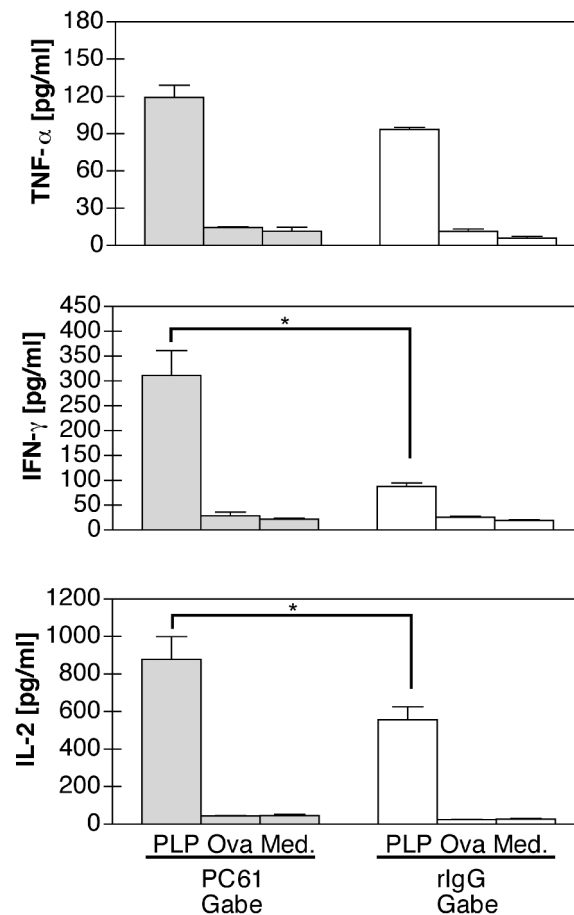


Abb. 11: Erhöhte proinflammatorische Zytokinproduktion während der späten Phase der EAE (Tag 92). $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen von SJL/J Mäusen wurden durch die Gabe von 1mg PC61 i.p. am Tag -5 depletiert. EAE wurde induziert mit $PLP_{139-151}$ (87 μ g) in CFA (200 μ g) s.c. am Tag 0. Am Tag 92 nach Immunisierung wurden Milzzellen aus Mäusen mit sekundär progressivem Krankheitsverlauf (PC61, graue Balken) und von Mäusen in Remission (rIgG, weiße Balken) mit 50 μ g/ml $PLP_{139-151}$ bzw. $Ova_{323-339}$ oder Medium restimuliert. TNF- α , IFN- γ and IL-2 Produktion in pg/ml in Balkendiagrammen sind dargestellt. * $P < 0,05$ Repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels ELISA.

Der Unterschied in der Pathologie von EAE aufgrund der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion ist bereits während der akuten Phase durch eine erhöhte proinflammatorische Zytokinproduktion in Antwort auf eine Antigen spezifische Stimulation der Lymphozyten sichtbar.

4.2 CTLA-4 Expression in B-Zellen beeinflusst die Antikörperproduktion während Thymus abhängiger Immunantworten

Aus der Literatur kamen in den letzten Jahren Hinweise, dass die Expression von CTLA-4 nicht nur auf das T-Zellkompartiment beschränkt ist, sondern CTLA-4 auch in B-Zellen exprimiert werden kann [96, 97, 152]. Dabei konnte Oberflächen CTLA-4 auf primären, murinen B-Zellen bisher nicht überzeugend dargestellt werden. Wir führten unter Nutzung der Liposomentechnik, welche die Markierung von auf der Zelloberfläche in geringen Mengen exprimierten Molekülen ermöglicht, den Nachweis für Oberflächen CTLA-4 auf B-Zellen. Des Weiteren sind die Signale, die zu einer Induktion von CTLA-4 mRNA und CTLA-4 Protein in B-Zellen führen, nicht verstanden. Unter Nutzung von sensitiven FACS-Anreicherungsverfahren und molekularen Analysen charakterisierten wir CTLA-4 in B-Zellen im Detail.

Erste Hinweise aus *in vitro* Studien deuten auf eine funktionelle Bedeutung von CTLA-4 auf B-Zellen für die Antikörperherstellung und den Antikörperklassenwechsel von B-Zellen hin [97, 152]. In dieser Arbeit untersuchten wir unter Verwendung von Knochenmarkschimären den Einfluß von CTLA-4 auf B-Zelleffektorfunktionen *in vivo*.

4.2.1 *In vitro* Untersuchungen zur Rolle von CTLA-4 in B-Zellen

4.2.1.1 Der Einfluss anderer Immunzellen und Stimulationsbedingungen auf die Expression von CTLA-4 in B-Zellen

Die Abhängigkeit der CTLA-4 Expression in B-Zellen von anderen Immunzellen, insbesondere den T-Zellen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [96, 97, 152]. Zur Untersuchung der Expression von CTLA-4 in B-Zellen wurden verschiedene Kultur- und Stimulationsbedingungen gewählt, um sowohl Thymus abhängige als auch Thymus unabhängige Immunantworten zu untersuchen. Dabei wurden B-Zellen entweder aus Milzen angereichert, T-Zelldepletierte Milzzellen mit Th2-Effektorzellen in Kultur gegeben oder aber Einzelzellsuspensionen aus Milzen eingesetzt.

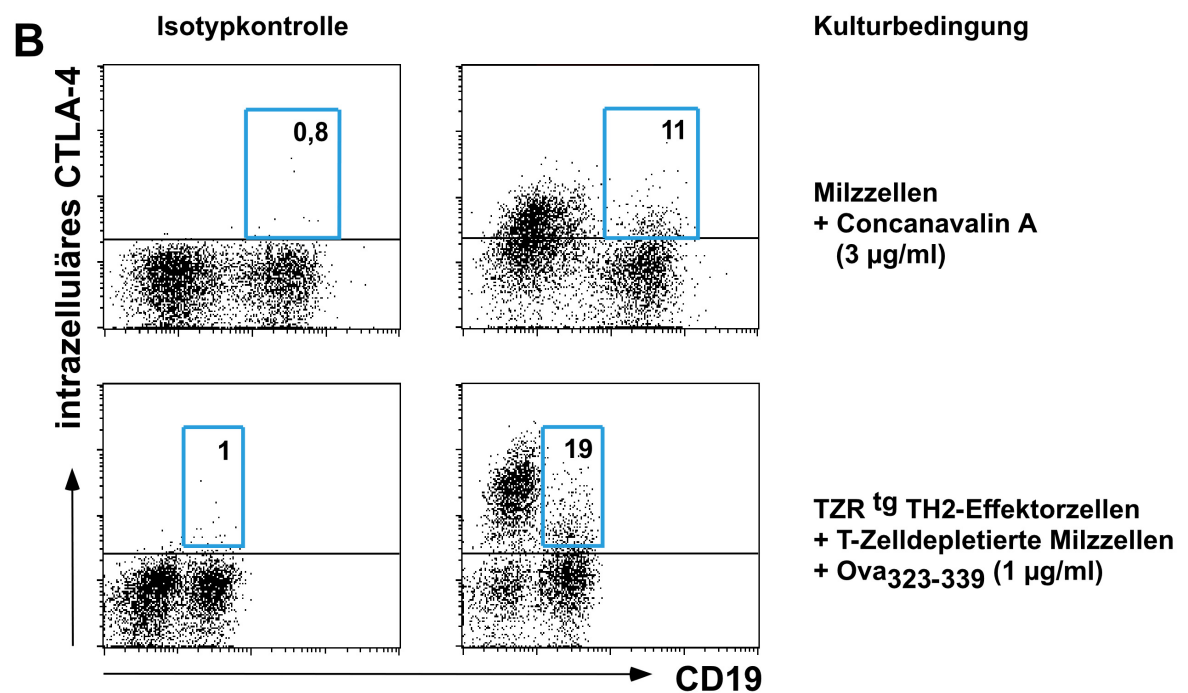
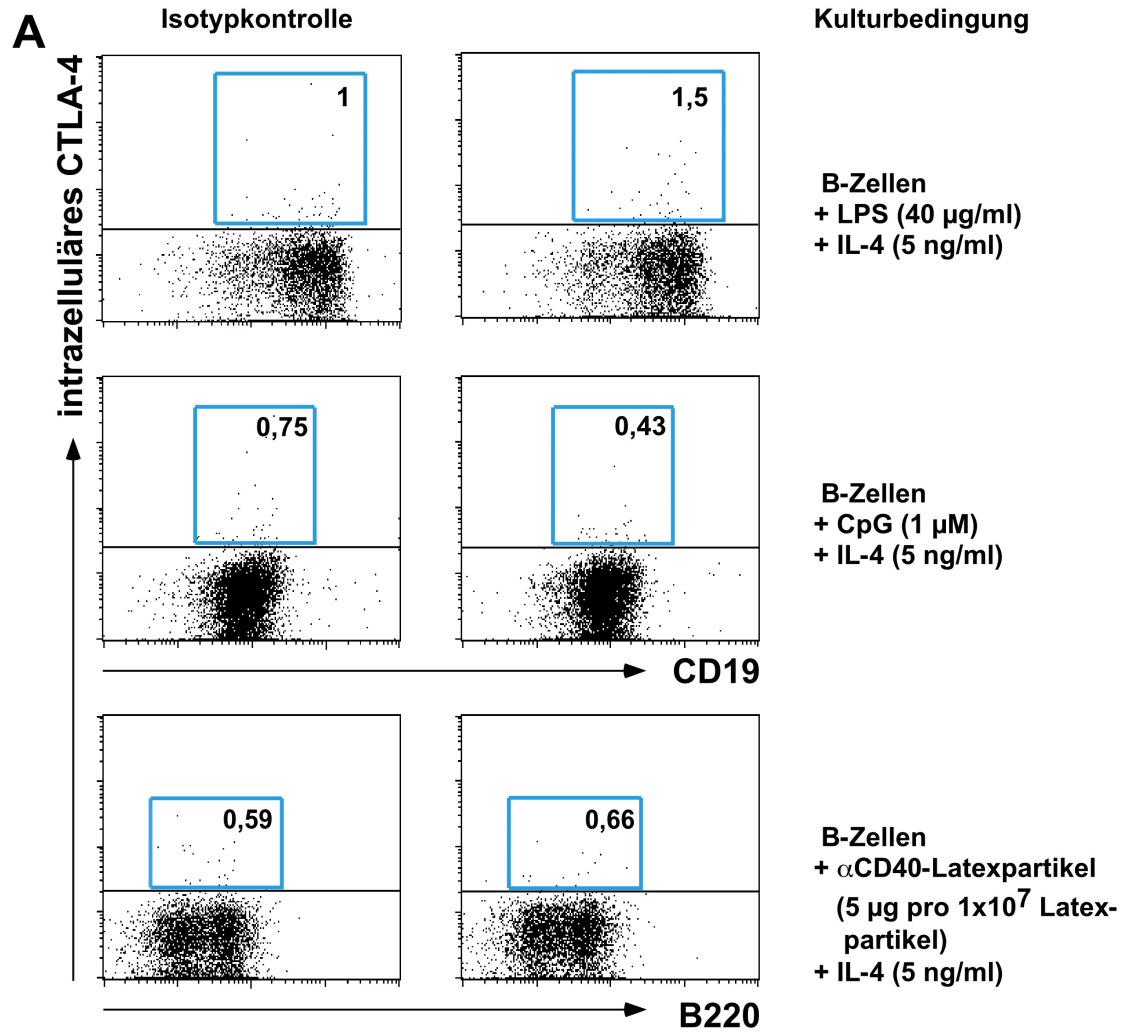


Abb. 12: CTLA-4-Protein wird in B-Zellen exprimiert, wenn ein T-Zell-vermitteltes Signal gegeben wird. A) Mittels MACS-Technologie durch Depletion von CD43⁺ Zellen erhaltene B-Zellen aus Milzen von Balb/c Mäusen wurden in einer Dichte von 1×10^6 /ml Zellen für 48h unter den angegebenen Kulturbedingungen stimuliert. Nach Fixierung der Zellen wurde in CD19⁺ bzw. B220⁺ Zellen zytometrisch intrazelluläres CTLA-4 markiert. Die Spezifität der Markierung wurde durch einen Isotyp-Antikörper (linke Spalte) kontrolliert. Die Zahlen oben rechts innerhalb der blau unterlegten Analysefenster stehen für Prozent CTLA-4⁺CD19⁺ bzw. CTLA-4⁺B220⁺ Zellen. Repräsentative Punktdiagramme aus 2-3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. **B)** Einzelzellsuspensionen aus Milzzellen von Balb/c Mäusen wurden für 48h in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml mit Con A stimuliert. Im zweiten Zellkulturansatz (untere Punktdiagramme) wurden Th2-Effektorzellen (gewonnen durch einwöchige Polarisierung von ehemals naiven TZR^{tg} T-Zellen aus DO11.10 Balb/c Mäusen) zusammen mit T-Zelldepletierten Milzzellen (durch Depletion von CD90⁺ Zellen mittels MACS-Technologie aus Balb/c Mäusen gewonnen) im Verhältnis von 1:4 in einer Gesamtzelldichte von $4,8 \times 10^6$ /ml mit Ova₃₂₃₋₃₃₉ für 48h stimuliert. Nach Fixierung der Zellen wurde in CD19⁺ bzw. B220⁺ Zellen intrazellulär zytometrisch CTLA-4 markiert. Die Spezifität der Markierung wurde durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert. Die Zahlen oben rechts innerhalb der blau unterlegten Analysefenster stehen für Prozent CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen. Repräsentative Punktdiagramme aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messungen für Experimente A und B erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

Zunächst reicherten wir B-Zellen aus Milzen von Balb/c Mäusen durch Depletion von CD43⁺ Zellen mit α CD43 magnetischen Mikropartikeln und MACS an. Die nicht markierten Zellen beinhalten die ruhenden B-Zellen mit einer Reinheit von ca. 97% (3.2.3.). Die B-Zellen wurden dann mit IL-4 und Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten (12h, 24h, 48h, 96h, 120h) die intrazelluläre CTLA-4 Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die mit LPS und IL-4 stimulierten B-Zellen produzierten kein CTLA-4 Protein (Abb.12A oben, Zeitpunkt 48h). Die Vitalität und Funktionsfähigkeit der B-Zellen wurden mittels Untersuchung der Aktivierungsmarker, der Proliferation und Antikörperproduktion in diesen Zellkulturansätzen erfolgreich überprüft (Daten nicht gezeigt). In mit α CD40-Latexpartikeln (α CD40 AK gekoppelt an Latexpartikel) und IL-4, CpG und IL-4 oder auch jeweils ohne IL-4 stimulierten B-Zellkulturen, konnte ebenfalls kein CTLA-4 Protein nachgewiesen werden (Abb.12A mitte/unten). Die α CD40-Latexpartikel und CpG Stimulationen wurden durch einen an Latexpartikel gekoppelten Isotypantikörper bzw. durch den Einsatz einer kein CpG Motiv enthaltenden DNA in gleichen Konzentrationen überprüft. Die B-Zellen wurden zum Zeitpunkt der Markierung von intrazellulärem CTLA-4 ebenfalls durchflußzytometrisch durch Detektion der Oberflächenmoleküle CD19 bzw. B220 identifiziert.

Die Abhängigkeit der CTLA-4 Expression in B-Zellen von T-Zellen wurde in einer anderen Zellkulturstrategie verfolgt. Es wurden B-Zellen in einem Zellgemisch aus T-Zelldepletierten Milzzellen, Th2-Effektorzellen und dem T-Zell spezifischen Antigen (hier Ovapeptid₃₂₃₋₃₃₉) inkubiert. Die T-Zelldepletierten Milzzellen, in denen sich die untersuchten B-Zellen befanden, wurden durch Depletion von CD90⁺ Zellen mit α CD90 magnetischen Mikropartikeln und MACS mit einer Reinheit von ca. 98% gewonnen. Die Th2-Effektorzellen wurden zuvor generiert, indem Ova-Antigen-monospezifische naive T-Zellen aus DO11.10 Balb/c Mäusen angereichert wurden (ca.98%) und diese für eine Woche unter Th2-Kulturbedingungen (3.2.4.) mit APZ und Ovapeptid₃₂₃₋₃₃₉ stimuliert wurden. Durch die Stimulation mit Th2-Effektorzellen konnte eine intrazelluläre CTLA-4 Expression in 19% der B-Zellen nachgewiesen werden (Abb.12B unten).

B-Zellen wurden durch das Oberflächenmolekül CD19 zytometrisch identifiziert. Die unspezifische zytometrische Markierung von CTLA-4 wurde routinemäßig durch den Einsatz eines entsprechenden Isotyp-Antikörpers (Abb.10A/B, jeweils linke Spalte) ausgeschlossen.

In Einzelzellsuspensionen aus Milzen, welche mit einem polyklonalen Stimulator Concanavalin A (Con A) stimuliert wurden, konnte ebenfalls CTLA-4 in B-Zellen nachgewiesen werden. Der Prozentsatz CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen lag hier bei 11% (Abb.12B oben). Eine Inkubation der Milzzellen in Medium ohne Stimulus führte nicht zu einer Expression von CTLA-4 in B-Zellen, wobei aber ca. 7% der T-Zellen positiv für CTLA-4 waren (Daten nicht gezeigt). Dies könnten CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen sein, welche konstitutive CTLA-4 exprimieren [24].

Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse zeigen eine T-Zell abhängige Expression von CTLA-4 in B-Zellen. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen konnten zwischen 11 und 19% CTLA-4⁺ B-Zellen identifiziert werden. In B-Zellen, kultiviert ohne T-Zellen, konnte unter den von uns gewählten Stimulationsbedingungen kein CTLA-4 Protein nachgewiesen werden.

4.2.1.2 Kinetik der intrazellulären CTLA-4 Proteinexpression in B-Zellen

Zur Untersuchung des Zeitfensters der CTLA-4 Expression in B-Zellen nach Stimulation wurden Milzzellen mit Con A aktiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn fixiert. Die zytometrische Detektion von intrazellulärem CTLA-4 erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.1.2. und unter 4.2.1.1.). Die Expression von CTLA-4 in B-Zellen ist erst ab 48h nach Stimulation detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt sind 15% CTLA-4⁺CD19⁺ B-Zellen sichtbar (Abb.13). Nach 72h ist noch eine leichte Steigerung des Prozentsatzes CTLA-4 positiver Zellen auf 20% aller CD19⁺ Zellen im dargestellten Datensatz zu verzeichnen. Die CTLA-4 Expression sinkt 96h nach Beginn der Stimulation auf 10% ab (Abb.13) und ist nach 6 Tagen nicht mehr nachweisbar. In anderen Experimenten der dreimal durchgeführten Kinetik trat die maximale CTLA-4 Expression auch bereits nach 48h ein. So lässt sich feststellen, dass das Maximum der CTLA-4 Expression zwischen 48-72h nach Stimulationsbeginn liegt. Die CTLA-4 Expression in B-Zellen ist transient, erst nach Aktivierung der Zelle wird CTLA-4 exprimiert. Das CTLA-4 Protein akkumuliert kurz oder nicht in der Zelle und nach Beendigung der Stimulation ist es nicht mehr detektierbar.

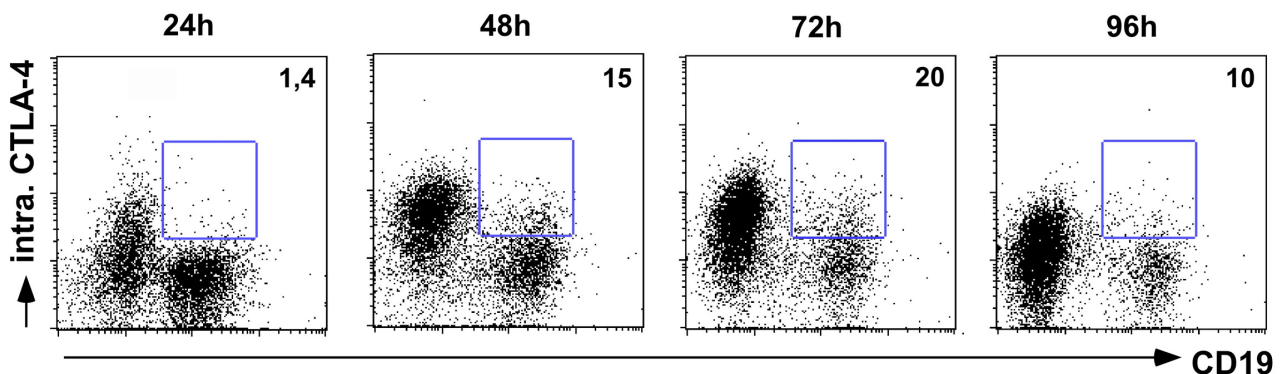


Abb. 13: Kinetik der intrazellulären CTLA-4 Expression in B-Zellen. Einzelzellsuspensionen aus Milzzellen von Balb/c Mäusen wurden für 24, 48, 72 bzw. 96h in einer Zelldichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ mit Con A ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Nach Fixierung der Zellen wurde in CD19⁺ Zellen intrazellulär zytometrisch CTLA-4 markiert. Die Analysefenster im Punktdiagramm wurden entsprechend einer Isotypkontrolle gesetzt. Die Zahlen oben rechts innerhalb der Punktdiagramme stehen für Prozent CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen. Repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

4.2.1.3 Expression von CTLA-4 in B-Zellen ist Mausstamm unabhängig

Die ersten Experimente innerhalb dieser Promotionsarbeit zur Klärung des Vorhandenseins von CTLA-4 in B-Zellen erfolgten alle im Mausstamm Balb/c. Neben der Fellfarbe und z.B. den unterschiedlichen MHC-Haplotypen gibt es noch weitere genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen. Für das Molekül BTLA sind beispielsweise Struktur- und Expressionspolymorphismen in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund verschiedener Mausstämmen beschrieben [153].

In dieser Arbeit wurde die CTLA-4 Expression auf B-Zellen in drei verschiedenen Mausstämmen untersucht (Balb/c, C57BL/6 und C57/BL10). Balb/c Mäuse unterscheiden sich von den beiden anderen Stämmen im MHC und genetischen Hintergrund. C57BL/6 und C57BL/10 Tiere sind gleich im MHC und ähnlich im genetischen Hintergrund, dennoch gibt es Unterschiede in einzelnen Chromosomen [154]. Außerdem sind z.B C57BL/10 Tiere im Vergleich mit C57BL/6 anfällig gegen Infektionen durch Coxackie Virus B1 [154, 155]. Es wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzen gewonnen und in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml in 5ml Gesamtvolumen für 48h mit Con A stimuliert. Die Fixierung der Zellen und durchflusszytometrische Markierung von intrazellulärem CTLA-4 erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.1.2. und unter 4.2.1.1.). Die Spezifität der zytometrischen CTLA-4 Markierung wurde jedes Mal durch den Einsatz eines Isotypes überprüft. In Abb.14 ist zu erkennen, dass sich die CTLA-4 Expression auf B-Zellen (identifiziert durch CD19) in den drei untersuchten Mausstämmen kaum unterscheidet. Es konnten CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen in Häufigkeiten von 15-19 Prozent für die unterschiedlichen Mausstämmen nachgewiesen werden. Der Unterschied von 4-5% zwischen C57BL/10 Tieren und den beiden anderen Mausstämmen liegt im Bereich der Standardabweichung zwischen verschiedenen Experimenten und ist daher nicht signifikant. In Bezug auf die Expression von CTLA-4 in B-Zellen liegt kein nachweisbarer Expressionspolymorphismus zwischen genetisch verschiedenen Mäusen vor (Abb.14).

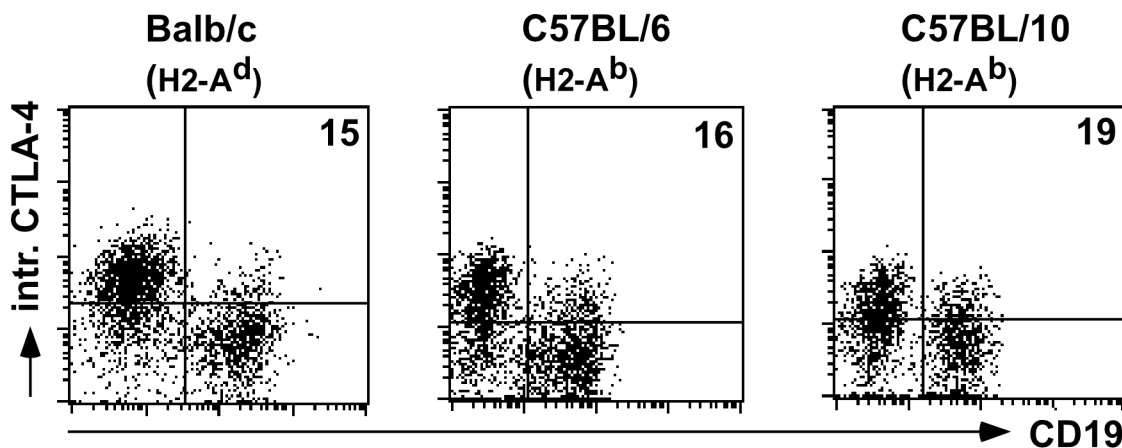


Abb. 14: Expression von CTLA-4 in B-Zellen ist Mausstamm unabhängig.

Einzelzellsuspensionen aus Milzzellen von den angegebenen Mausstämmen wurden in einer Dichte von 5×10^6 /ml Zellen für 48h mit Con A (5 μ g/ml) und IL-4 (30 ng/ml) stimuliert. Nach Fixierung der Zellen wurde in $CD19^+$ Zellen intrazellulär zytometrisch CTLA-4 markiert. Die Analysequadranten wurden entsprechend einer Isotypkontrolle gesetzt. Die Zahlen im oberen rechten Quadranten der Punktdiagramme stehen für Prozent $CTLA-4^+CD19^+$ Zellen. Repräsentative Daten aus 2-5 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

4.2.1.4 CTLA-4 in B-Zellen ist kein Molekültransfer von T-Zellen

Unsere Daten zeigen, dass B-Zellen nur in Anwesenheit von T-Zellen CTLA-4 exprimieren (Abb.12). Molekültransfer zwischen Immunzellen wurde mehrfach beschrieben [156, 157]. So können B-Zellen beispielsweise Antigen von mit Antigen transfizierten myeloiden Zellen übernehmen. Ein Molekültransfer von T- auf B-Zellen ist bisher nicht beschrieben, eher ist bei Zellkontakt dieser Partner ein unidirektionaler Zellaustausch von B- auf T-Zellen festgestellt worden [158, 159].

Zum eindeutigen Ausschluss der Möglichkeit des interzellulären Molekültransfers von T- auf B-Zellen wurden $CTLA-4^{-/-}$ C57BL/6 B-Zellen in $CTLA-4^{+/+}$ C57/BL6 T-Zellkultur stimuliert. Sollten unter diesen Kulturbedingungen CTLA-4 positive B-Zellen in den $CTLA-4^{-/-}$ C57BL/6 B-Zellen sichtbar werden, muss es sich um einen Molekültransfer handeln, denn $CTLA-4^{-/-}$ C57BL/6 B-Zellen können durch genetische Inaktivierung des CTLA-4 Gens kein CTLA-4 synthetisieren. Die T-Zelldepletierten Milzzellen (Reinheit ca. 98%) der jeweiligen Tiere wurden durch Depletion von $CD90^+$ T-Zellen mit $\alpha CD90$ magnetischen Mikropartikeln und MACS gewonnen. Die CTLA-4 kompetenten T-Zellen aus $CTLA-4^{+/+}$ C57BL/6 Tieren wurden per MACS-Sort mit $\alpha CD4$ magnetischen Mikropartikeln angereichert. Die Reinheit der T-Zellen lag hier bei >95%. In den in Abbildung 15 A und B dargestellten Ergebnissen wurden die T-Zelldepletierten Milzzellen aus $CTLA-4^{-/-}$ bzw. $CTLA-4^{+/+}$ Tieren jeweils mit CTLA-4 kompetenten T-Zellen gemischt

und für 48h mit Con A stimuliert. Zur Überprüfung des Aktivierungszustandes der B-Zellen nach der Kulturdauer wurden diese für CD69 markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb.15A). Es gab keinen Expressionsunterschied für CD69, das heißt, die B-Zellen waren in einem ähnlichen Aktivierungszustand (Abb.15A). Es konnte nur intrazelluläres CTLA-4 in den CTLA-4^{+/+} C57BL/6 B-Zellen detektiert werden, nicht aber in den B-Zellen aus CTLA-4^{-/-} Tieren (Abb.15B). In beiden Kulturen konnte aber CTLA-4 in den T-Zellen sichtbar gemacht werden.

In einem weiteren Kulturansatz wurden die T-Zelldepletierten Milzzellen aus den CTLA-4^{+/+} C57BL/6 und den CTLA-4^{-/-} C57BL/6 zu gleichen Teilen gemischt und zusammen mit CTLA-4 kompetenten T-Zellen stimuliert. Zur Identifizierung der unterschiedlichen B-Zellen aus den T-Zelldepletierten Milzzellen wurden die T-Zelldepletierten Milzzellen aus den CTLA-4^{-/-} Tieren vor der Zugabe zum Zellgemisch mit CFSE markiert. In Abb.15C zeigt das Punktdiagramm die Identifizierung der beiden B-Zellfraktionen anhand von CD19⁺ und CFSE⁺ bzw. CFSE⁻ Zellen. In beiden Populationen wurde nun die Expression von intrazellulärem CTLA-4 verglichen. Es exprimierten 27% der CTLA-4^{+/+} B-Zellen CTLA-4, aber die CTLA-4^{-/-} B-Zellen waren negativ für CTLA-4 (Abb.15C).

Dieser Datensatz dokumentiert, dass B-Zellen kein CTLA-4 von T-Zellen aufnehmen, selbst wenn diese in einer Kokultur viel CTLA-4 exprimieren. Dass B-Zellen CTLA-4 transkribieren, translatieren und auf die Oberfläche bringen, wird unter 4.2.1.5. und 4.2.1.6. weiter untermauert.

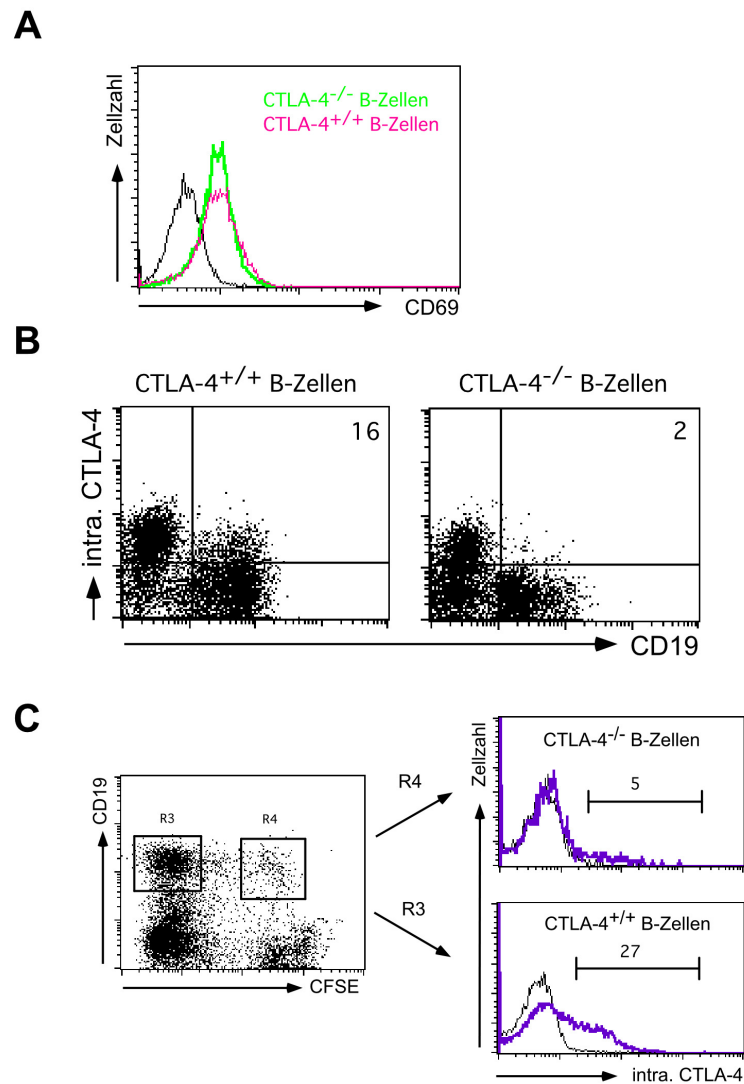


Abb. 15: CTLA-4^{-/-} B-Zellen zeigen kein CTLA-4 in T-Zellkultur, in der T-Zellen CTLA-4 kompetent sind. T-Zelldepletierte Milzzellen wurden aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 bzw. CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Milzen durch Depletion von CD90⁺ Zellen mittels MACS gewonnen. T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 Tieren wurden durch positive Sortierung von CD4⁺ Zellen mittels MACS-Technologie gewonnen. In den Kulturen unter A) und B) wurden die jeweiligen T-Zelldepletierten Milzzellen im Verhältnis 4:1 mit den CTLA-4^{+/+} T-Zellen in einer Zelldichte von $4,8 \times 10^6$ /ml für 48h mit Con A (5 µg/ml) und IL-4 (30 ng/ml) stimuliert. **A)** Im Histogramm ist die zytometrische Markierung für CD69 auf den CTLA-4^{+/+} C57BL/6 bzw. CTLA-4^{-/-} C57BL/6 B-Zellen dargestellt. Die schwarze Linie dokumentiert die Fluoreszenzintensität der nicht CD69 markierten CTLA-4^{+/+} C57BL/6 B-Zellen. **B)** Nach Fixierung der Zellen wurde in CD19⁺ Zellen intrazellulär zytometrisch CTLA-4 markiert. Das Analysefenster wurde entsprechend einer Isotypkontrolle gesetzt. Die Zahlen im oberen rechten Quadranten der Punktdiagramme stehen für Prozent CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen. **C)** T-Zelldepletierte Milzzellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 bzw. CTLA-4^{-/-} C57BL/6 wurden 1:1 vereint und im Verhältnis von 4:1 in einer Zelldichte von $4,8 \times 10^6$ /ml zu T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} C57BL/6 Tieren gegeben. Die T-Zelldepletierten Milzzellen aus den CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert. Die intrazelluläre CTLA-4 Expression auf den CD19⁺CFSE⁻ (Analysefenster R3) bzw. den CD19⁺CFSE⁺ (Analysefenster R4) Zellen wurde bestimmt. In den Histogrammen sind die CTLA-4 Markierungen (lila Graph) und jeweiligen Isotypkontrollen (schwarzer Graph) dargestellt; die Zahlen stehen für Prozent positive Zellen innerhalb der ausgewiesenen Analysefenster. Für A), B) und C) gilt, dass repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt sind. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

4.2.1.5 Oberflächenexpression von CTLA-4 auf B-Zellen

Zur Interaktion von CTLA-4 mit seinen bisher beschriebenen Interaktionspartnern B7-1 und B7-2 muss CTLA-4 auf der Zelloberfläche exprimiert werden [56]. CTLA-4 Moleküle sind auf der T-Zelloberfläche nur in geringer Zahl exprimiert und können daher mit konventionellen Färbetechniken nicht nachgewiesen werden. Mit der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Liposomentechnik für den Nachweis von Oberflächen CTLA-4 wurde die Expression des Moleküls auf B-Zellen untersucht [72, 73]. Diese Färbetechnik ist ungefähr 1000-fach empfindlicher als konventionelle Immunfluoreszenz und ermöglicht den Nachweis von weniger als 100 CTLA-4 Molekülen auf der Zelloberfläche. Nach Abschluss der Stimulation (4.2.1.1.) wurden die Fc γ -Rezeptoren blockiert, um dann in einem Multi-Step Verfahren die Markierung von Oberflächen CTLA-4 auf B-Zellen durchzuführen. Die Spezifität der zytometrischen CTLA-4 Markierung und Detektion wurde durch eine Blockierung des CTLA-4 Epitopes durch einen unkonjugierten CTLA-4 Antikörper kontrolliert und die unspezifische Hintergrundmessung von den zytometrisch detektierten Prozentsätzen der CTLA-4 Markierung subtrahiert (linke Spalte in Abb.16). In beiden T-Zell abhängigen Stimulationen der B-Zellen sind zwischen 11-15% Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ B-Zellen nachweisbar (Abb.16). Im Folgenden wurde der Aktivierungszustand Oberflächen CTLA-4⁺ Zellen mit dem Oberflächen CTLA-4⁻ Zellen verglichen, um mögliche funktionelle Konsequenzen der CTLA-4 Expression auf den B-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden zytometrisch Oberflächenmoleküle untersucht, die nach Aktivierung induziert werden (CD69) bzw. deren Expressionsstärke sich nach Aktivierung verändert (CD40, MHC und CD86). Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ B-Zellen machen nur ca. 15% aller B-Zellen in den Zellkulturen aus. Um eine genügend hohe Zahl registrierter Zellen im Durchflusszytometer analysieren zu können, wurden die B-Zellen nach Beendigung der Stimulationszeit von 48h durch den Einsatz von α CD19 magnetischen Mikropartikeln und MACS angereichert (3.2.3.). Die Analyse der Expression von CD69, MHC, CD40 und CD86 (B7-2) auf Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen gegenüber Oberflächen CTLA-4⁻CD19⁺ Zellen aus gleicher Kultur zeigte keine Unterschiede (Abb.17). Die Expression von CD86 auf CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen war gegenüber der CD86 Expression auf CTLA-4⁻CD19⁺ Zellen nicht erniedrigt, was eine unspezifische äußere Anheftung des CTLA-4 Moleküls aus T-Zellen auf dem B7 Molekül der B-Zellen unwahrscheinlich macht (Abb.17). Die leicht geringere Intensität der CD86 Markierung auf CTLA-4⁻CD19⁺ Zellen gegenüber CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen war nicht in allen

Experimenten zu verzeichnen und ist daher als nicht signifikanter Unterschied zu vernachlässigen.

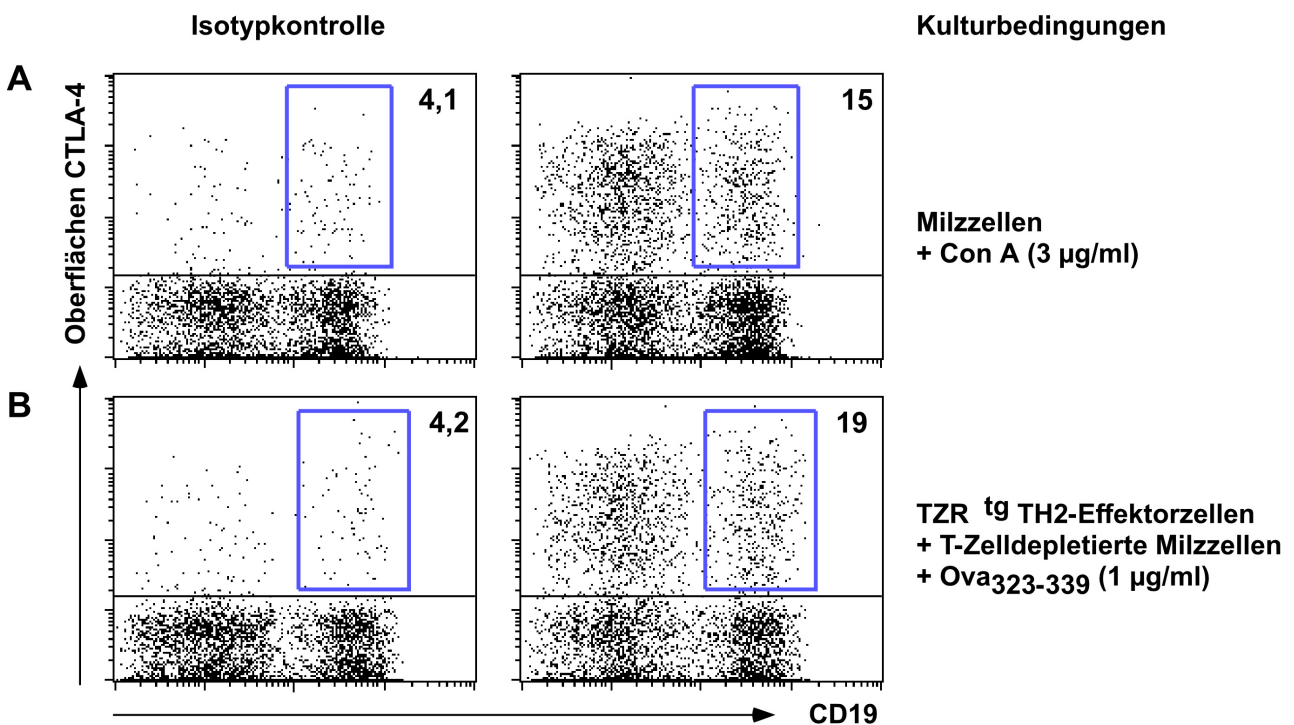


Abb. 16: B-Zellen exprimieren Oberflächen CTLA-4 in T-Zellabhängigen Stimulationen *in vitro*. **A)** Einzelzellsuspensionen aus Milzzellen von Balb/c Mäusen wurden für 48h in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml mit Con A (3 µg/ml) stimuliert. **B)** Th2-Effektorzellen (gewonnen durch einwöchige Polarisierung von ehemals naiven TZR^{tg} T-Zellen aus DO11.10 Balb/c Mäusen) wurden zusammen mit T-Zelldepletierten Milzzellen (durch Depletion von CD90⁺ Zellen mittels MACS-Technologie aus Balb/c Mäusen gewonnen) im Verhältnis von 1:4 in einer Gesamtzelldichte von $4,8 \times 10^6$ /ml mit Ova₃₂₃₋₃₃₉ für 48h stimuliert. Auf CD19⁺ Zellen wurde mit der Liposomentechnik Oberflächen CTLA-4 sichtbar gemacht. Die Spezifität der zytometrischen CTLA-4 Markierung wurde durch eine Blockierung des CTLA-4 Epitopes durch einen unkonjugierten CTLA-4 Antikörper kontrolliert. Die Zahlen oben rechts innerhalb der Punktdiagramme stehen für Prozent CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen. Repräsentative Punktdiagramme aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Diese Ergebnisse beweisen, dass CTLA-4 auf der Zelloberfläche von B-Zellen mit der hochsensitiven Liposomentechnik eindeutig nachweisbar ist. Unter den Kulturbedingungen einer mit Con A aktivierten Einzelzellsuspension aus Milzzellen oder auch Th2-Effektorzellen zusammen mit T-Zelldepletierten Milzzellen und Antigen ist Oberflächen CTLA-4 auf B-Zellen nachweisbar. Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ B-Zellen aus diesen Stimulationen unterscheiden sich nicht in der Expression von CD69, CD40, MHC und B7-2 von den Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen, das heißt, sie befinden sich im gleichen Aktivierungszustand.

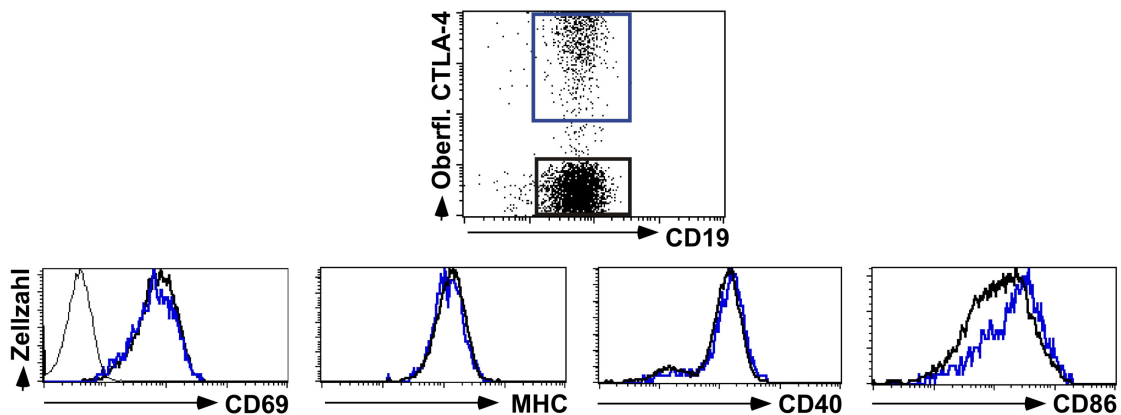


Abb. 17: Oberflächen CTLA-4 positive B-Zellen exprimieren CD69, MHC, CD40 und CD86. Th2-Effektorzellen (gewonnen durch einwöchige Polarisierung von ehemals naiven TZR^{tg} T-Zellen aus DO11.10 Balb/c Mäusen) wurden zusammen mit T-Zelldepletierten Milzzellen (durch Depletion von CD90⁺ Zellen mittels MACS-Technologie aus Balb/c Mäusen gewonnen) im Verhältnis von 1:4 in einer Gesamtzelldichte von $4,8 \times 10^6/\text{ml}$ mit Ova₃₂₃₋₃₃₉ für 48h stimuliert. Im Anschluss wurden CD19⁺ Zellen mittels MACS-Technologie angereichert und die Expression der angegebenen Zelloberflächenmarker auf Oberflächen CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen (blaue Linien) bzw. Oberflächen CTLA-4⁻CD19⁺ Zellen (schwarze Linie) durch Markierung mit jeweiligen Antikörpern untersucht. Oberflächen CTLA-4 wurde dabei mit der Liposomentechnik sichtbar gemacht. Die Spezifität der zytometrischen CTLA-4 Markierung wurde durch eine Blockierung des CTLA-4 Epitopes durch einen unkonjugierten CTLA-4 Antikörper kontrolliert. Repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

4.2.1.6 mRNA-Nachweis für CTLA-4 in B-Zellen

Der Nachweis der mRNA für CTLA-4 in B-Zellen wurde mit der Technik der Reversen Transkription PCR (RT-PCR) geführt. Zum relativen Mengenvergleich und Nachweis des Intaktseins der cDNA Proben wurde routinemäßig die mRNA eines Haushaltsgen, β -Aktin, analysiert.

Eine Zellkultur mit Th2-Effektorzellen, T-Zelldepletierten Milzzellen und Antigen (Abschnitt 4.2.1.1.) wurde angesetzt. Die Zellkultur wurde 24h nach Beginn der Stimulation beendet und die B-Zellen zunächst mittels MACS, dann mit FACS bis zu 99,9% Reinheit angereichert (Abb.18A). Die B-Zellen wurden für die Isolierung der RNA und anschließende Synthese von cDNA verwendet (3.2.5.). Abbildung 18B zeigt das Ergebnis der RT-PCR für CTLA-4 und β -Aktin aus den hochreinen B-Zellen, der T-Zellfraktion (gewonnen aus dem α CD90 Sort) und aus dendritischen Zellen (DC), welche aus Knochenmarksvorläuferzellen in einer sechs Tage Kultur generiert wurden (3.2.2.). In allen drei Zellfraktionen war β -Aktin nachweisbar. Die T-Zellen zeigten eine starke Expression der CTLA-4 mRNA (Abb.18B und [160]). Die mRNA für CTLA-4 konnte zusätzlich in den aktivierten B-Zellen nachgewiesen werden (Abb.18B). Die Spezifität der amplifizierten cDNA für CTLA-4 wurde durch Sequenzierung kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

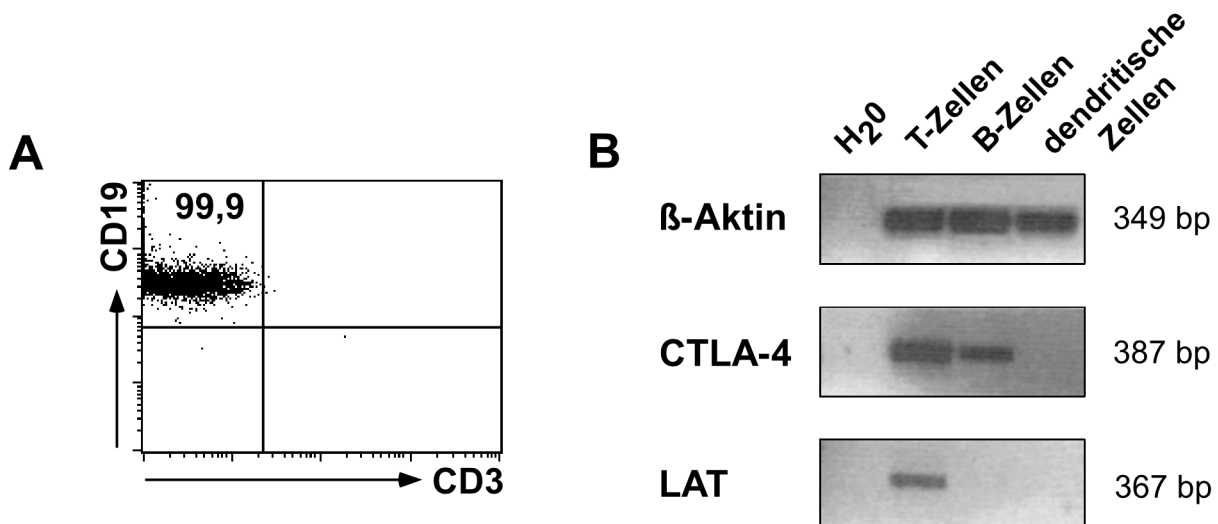


Abb. 18: mRNA für CTLA-4 ist in primären B-Zellen nachweisbar. Th2-Effektorzellen (gewonnen durch einwöchige Polarisierung von ehemals naiven TZR^{tg} T-Zellen aus DO11.10 Balb/c Mäusen) wurden zusammen mit T-Zelldepletierten Milzzellen (durch Depletion von CD90⁺ Zellen mittels MACS-Technologie aus Balb/c Mäusen gewonnen) im Verhältnis von 1:4 in einer Gesamtzellkonzentration von $4,8 \times 10^6/\text{ml}$ und Ova₃₂₃₋₃₃₉ für 24h stimuliert. Nach 24h wurden die B-Zellen mittels MACS-Technologie angereichert und anschließend unter Markierung von CD19 und CD3 mittels FACS-Technologie weitersortiert. **A)** Das Punktdiagramm zeigt den Prozentsatz der lebenden CD19⁺ Zellen nach der Anreicherung. **B)** Die RNA der B-Zellen unter A), der aus gleicher Zellkultur durch Depletion gewonnenen T-Zellen und aus Knochenmark gereiften dendritischen Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR amplifiziert. Unspezifische Amplifikate durch Kontamination oder Primer-Dimere wurden in einer PCR ohne cDNA (H₂O) kontrolliert. Als Haushaltsgen wurde in allen cDNA Proben β-Aktin nachgewiesen. Der Nachweis von LAT soll eine Verunreinigung der B-Zellen mit T-Zellen ausschließen. Repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, Reverse Transkriptase PCR und Gelelektrophorese.

Um eine T-Zellen cDNA Kontamination in den cDNA Proben der B-Zellen auszuschließen, wurde eine T-Zell spezifische cDNA nachgewiesen. Daher wurde der Nachweis für den linker for activation of T-cells (LAT) geführt, ein in T-Zellen exprimiertes Adapter-Molekül (3.2.5.). Dieses Molekül ist nicht in primären B-Zellen aus Milzen nachweisbar [161, 162]. Abb. 18B dokumentiert eindeutig das Vorhandensein der mRNA für LAT in den T-Zellproben, nicht aber in den Proben der hochreinen B-Zellpopulation bzw. den Proben der dendritischen Zellen, so dass eine Kontamination letztgenannter Proben mit T-Zellen ausgeschlossen ist. Im gegebenen experimentellen Aufbau konnte 24h nach Beginn der Stimulation die mRNA für CTLA-4 in B-Zellen nachgewiesen werden. Die Kulturbedingungen, unter denen die mRNA für CTLA-4 und das CTLA-4 Protein nachgewiesen wurden, sind die gleichen (4.2.1.5.). Dies zeigt, dass B-Zellen das CTLA-4 Gen transkribieren.

4.2.1.7 CD19 Antikörper-Vernetzung induziert CTLA-4 mRNA Expression in B-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Faktoren für die Induktion von CTLA-4 auf B-Zellen unbekannt. Lösliche Faktoren, beispielsweise IL-4, die für die Induktion von CTLA-4 verantwortlich sein könnten, wurden bereits (Abb.12) ausgeschlossen. Des Weiteren wurde der Einfluss von CD19, einem Korezeptor, im Korezeptorkomplex mit CD21 und CD22 auf die Induktion von CTLA-4 in B-Zellen untersucht.

Um eine Beteiligung von CD19 an der CTLA-4 Induktion zu erforschen, wurden B-Zellen auf zwei unterschiedlichen Wegen aus Milzzellen angereichert. Nach einer Anreicherung von B-Zellen (98% Reinheit) durch α CD19 magnetische Mikropartikel und MACS (3.2.3.) und anschließender 5stündiger Inkubation der Zellen in Medium bei 37°C, lässt sich mittels PCR die mRNA für CTLA-4 in diesen Zellen nachweisen (3.2.5., Abb.19A). Eine Anreicherung von B-Zellen durch Depletion von CD43⁺ Zellen (ca. 97% Reinheit) mit α CD43 magnetischen Mikropartikeln und MACS (CD43⁻ Sortierung) führt nach anschließender 5stündiger Inkubation der Zellen in Medium bei 37°C nicht zur Induktion der CTLA-4 mRNA in diesen Zellen (Abb.19A).

Die Anreicherung von B-Zellen mit α CD19 magnetische Mikropartikel und MACS führte wahrscheinlich zu einer Kreuzvernetzung des CD19 Moleküls auf der Oberfläche der B-Zellen. Dies wurde auf einem zweiten Weg bestätigt, indem B-Zellen aus Milzzellen von C57BL/6 Tieren durch eine CD43⁻ Sortierung gewonnen und im Anschluss CD19 mit α CD19 Latexpartikeln (CD19 Ak an Latexpartikel gekoppelt) für 24h bei 37°C kreuzvernetzt wurden (3.2.4.). Durch diese Behandlung der Zellen ist ebenfalls eine Induktion der mRNA für CTLA-4 nachweisbar (Abb.19B). Werden die so gewonnenen B-Zellen nur mit Medium inkubiert, kommt es nicht zur Induktion der CTLA-4 mRNA (Abb.19B).

Zur Überprüfung der Qualität und zum Mengenvergleich der cDNA Proben, wurde für jede Probe parallel zur mRNA für CTLA-4 der Nachweis der mRNA für das ubiquitär verbreitete Protein β -Aktin geführt (3.2.5.). Für diese Teilexperimente wurde ein weiteres Oligomerpaar für den Nachweis von CTLA-4 mRNA verwendet, das zu einem 687bp langen PCR Produkt führt (Abb.19). Diese Oligomere sind so gewählt, dass das Produkt den zytoplasmatischen Teil des CTLA-4 Proteins einschliesst. Die mRNA für CTLA-4 in B-Zellen, in denen das CD19 Molekül getriggert wurde, konnte eindeutig nachgewiesen werden (Abb.19B). Dies gilt aber nicht für die Translation, denn in CD19⁺ sortierten B-Zellen, die im Anschluss mit α CD40 und IL-4 stimuliert wurden, konnte kein CTLA-4 Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass CTLA-4 mRNA in B-Zellen durch Kreuzvernetzung von CD19 induziert werden kann, zur Translation des Proteins bedarf es aber eines oder mehrerer weiterer Signale. Wie in Abb.12 gezeigt wurde, muss dieses Signal von T-Zellen kommen.

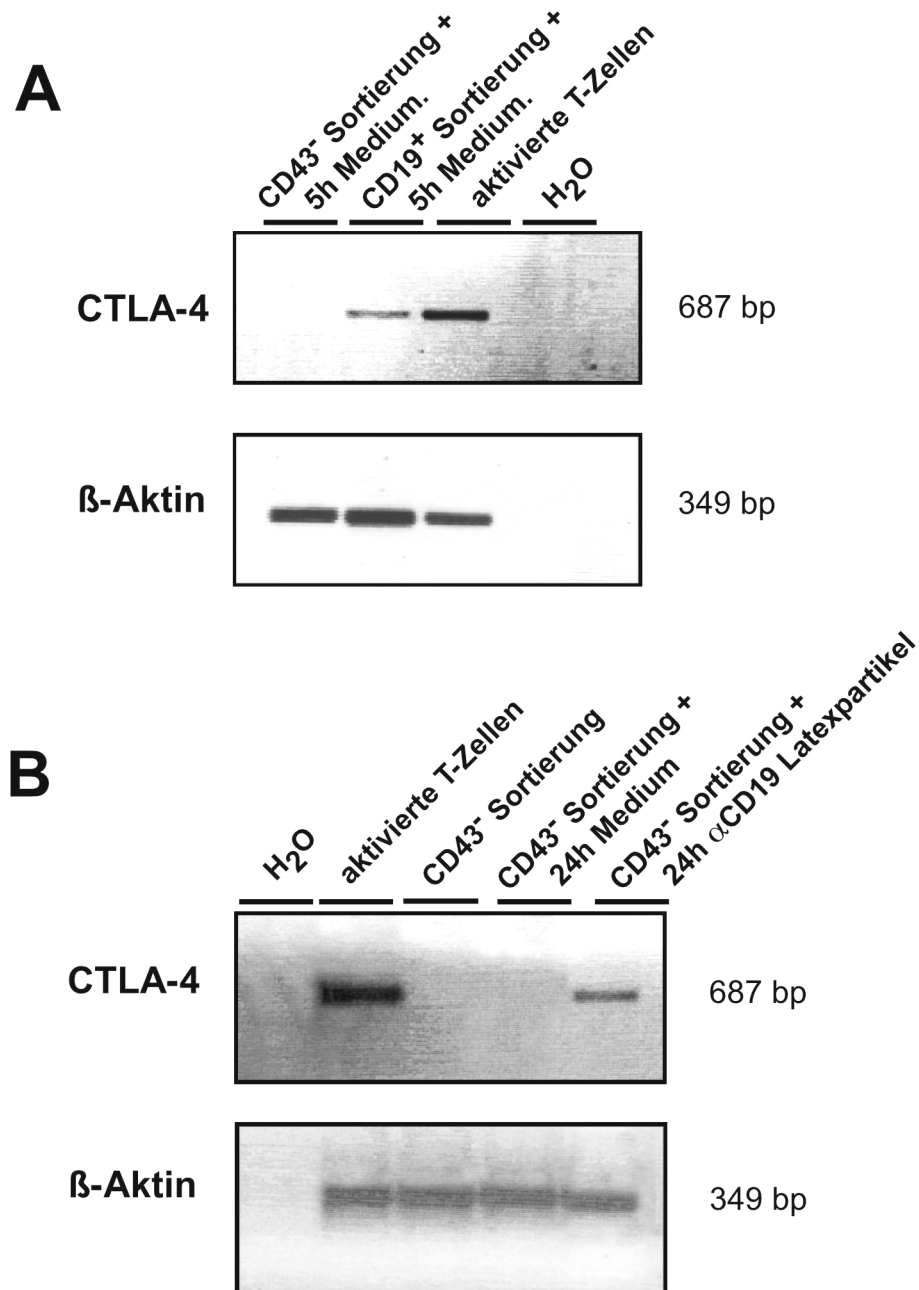


Abb. 19: mRNA für CTLA-4 wird über CD19 induziert. **A)** B-Zellen wurden aus Milzzellen von C57BL/6 Mäusen durch Depletion von CD43⁺ Zellen mit αCD43 Mikropartikeln bzw. durch Sortierung mit αCD19 Mikropartikeln mittels MACS-Technologie gewonnen. Die angereicherten B-Zellen wurden für 5h mit Medium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde von diesen B-Zellen RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR der Nachweis für CTLA-4 und β-Aktin geführt. Unspezifische Amplifikate durch Kontamination oder Primer-Dimere wurden in einer PCR ohne cDNA (H₂O) kontrolliert. Messung mittels Reverse Transkriptase PCR und Gelelektrophorese. **B)** B-Zellen wurden aus Milzzellen durch Depletion von CD43⁺ Zellen mit αCD43 magnetischen Mikropartikeln und MACS angereichert. Die B-Zellen wurden im Anschluss für 24h mit Medium bzw. αCD19 Latexpartikel in einer Zelldichte von 1x10⁶/ml bei 37°C inkubiert. Die RNA der B-Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR der Nachweis für CTLA-4 und β-Aktin geführt. Unspezifische Amplifikate durch Kontamination oder Primer-Dimere wurden in einer PCR ohne cDNA (H₂O) kontrolliert. Repräsentative Daten aus 2-3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Messung erfolgte mittels Reverse Transkriptase PCR und Gelelektrophorese.

4.2.2 *In vivo* Untersuchungen zur Rolle von CTLA-4 in B-Zellen

Zur Aufklärung der Rolle von CTLA-4 in B-Zellen *in vivo* wurden knochenmarkschimäre Mäuse generiert. In diesem Verfahren wurden Tiere erzeugt, in denen CTLA-4 nur im B-Zellkompartiment fehlt [50]. Eine Thymus abhängige Immunantwort wurde in diesen Tieren durch eine Immunisierung mit DNP-KLH in Alum ausgelöst und die Immunantwort analysiert.

4.2.2.1 Zellrekonstitution und natürliche IgM und IgG Antikörper unterscheiden sich nicht in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären

Zunächst wurden die Empfängertiere, C57BL/6 Mäuse, letal bestrahlt, wodurch deren peripheren Zellen und alle Knochenmarksvorläuferzellen depletiert wurden. Im Anschluss wurden die C57BL/6 Tiere mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus C57BL/6 Tieren (= CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären) bzw. mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären) i.v. rekonstituiert (3.2.13.). Durch Genmanipulation am Membran-Exon der schweren Immunoglobulinkette kommt es in μ MT C57BL/6 Mäusen zu einem B-Zell Entwicklungsstopp auf der Stufe des Pre-B-Zellstadiums, wodurch alle peripheren B-Zellen fehlen [144, 163]. Durch Kombination des Knochenmarks aus μ MT-Mäusen und aus CTLA-4^{-/-} Tieren entstehen chimäre Mäuse, in denen alle B-Zellen kein CTLA-4 exprimieren können. Acht Wochen nach Rekonstitution sind alle Immunzellen in den Chimären nachweisbar (3.2.13). Durchflusszytometrisch wurde der Prozentsatz peripherer B- und T-Zellen in den Chimären verglichen. Dafür wurden die Zellen aus dem Blut mit α CD19 bzw. α CD4 markiert und zytometrisch analysiert (3.2.1.1.).

Mit $57 \pm 5\%$ CD19⁺Zellen ist die Rekonstitution der B-Lymphozyten in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber $52 \pm 5\%$ B-Zellen in den CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären gleich (Abb.20A). Ebenso sind die CD4-Zellen mit $22 \pm 2\%$ und $26 \pm 2\%$ in den beiden Chimären-Gruppen in gleicher Häufigkeit repopuliert (Abb.20B).

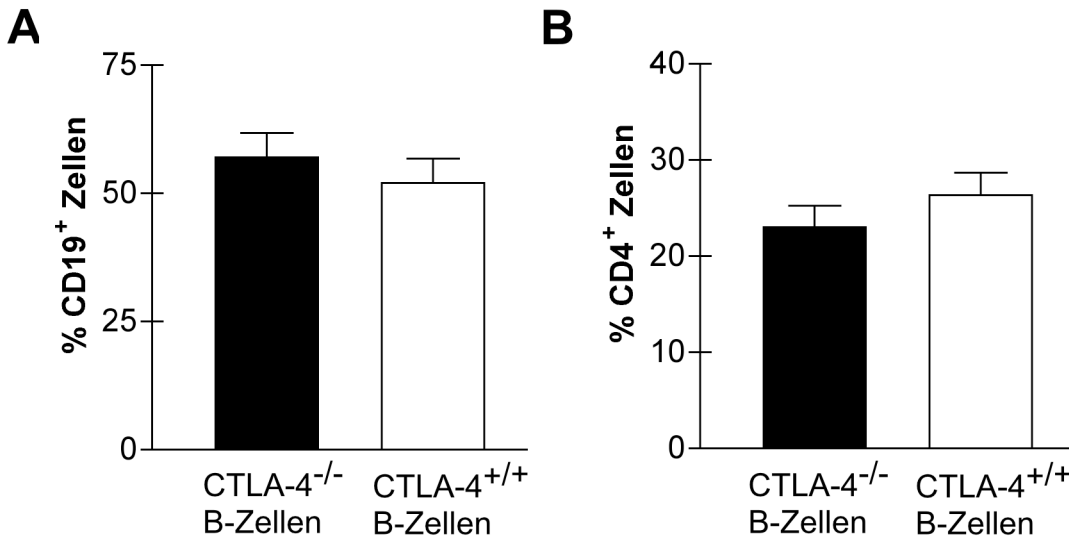


Abb. 20: Zellrekonstitution in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären ist normal verteilt. C57BL/6 Tiere wurden bestrahlt und ein Tag später mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus C57BL/6 Tieren (= CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären) bzw. mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären) i.v. rekonstituiert. Acht Wochen nach Rekonstitution wurde das Blut auf den Anteil an B-Zellen (CD19⁺) (**A**) und T-Zellen (CD4⁺) (**B**) untersucht. Die Balkendiagramme zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Zellen als Mittelwert von 5-6 Tieren \pm Standardabweichung. Repräsentativer Datensatz aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Messung mittels Durchflusszytometrie.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Entwicklung und Homeostase peripherer B-Zellen und CD4 Zellen durch die Expression von CTLA-4 in B-Zellen unverändert bleibt.

In unbehandelten Mäusen sind bereits vor einer Immunisierung Immunglobulin-Titer der verschiedenen Klassen messbar. Diese natürlichen Ak werden vor allem von B1-B-Zellen produziert und richten sich gegen Nukleinsäuren, Hitzeschockproteine, Kohlenhydrate und Phospholipide [39]. Acht Wochen nach Rekonstitution wurden die Chimären auf die natürlich vorkommenden Antikörper der IgM und IgG- Klassen untersucht. Die Mittelwerte der relativen Titer für die natürlichen IgM-Antikörper betragen $2,96 \pm 1,45$ für die CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären und $3,22 \pm 1,18$ für die CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären (Abb.21A). Der Mittelwert der relativen Titer für die natürlichen IgG Ak beträgt in den Chimären, in denen alle B-Zellen CTLA-4^{-/-} sind $1,87 \pm 0,72$ und für die Chimären, in denen alle B-Zellen CTLA-4 kompetent sind $2,13 \pm 0,70$ (Abb.21B).

Die natürlichen IgM und IgG Ak Titer vor der Immunisierung sind von der CTLA-4 Expression auf B-Zellen unbeeinflusst.

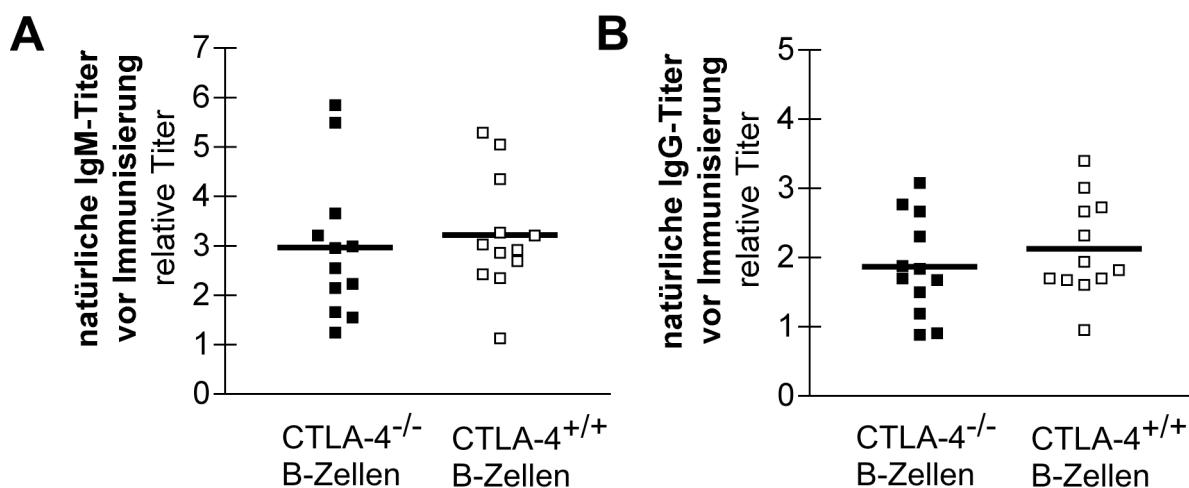


Abb. 21: Natürliche IgM und IgG Titer vor Immunisierung sind unverändert in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären. C57BL/6 Tiere wurden bestrahlt und ein Tag später mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus C57BL/6 Tieren (= CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären □) bzw. mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären ■) i.v. rekonstituiert. Acht Wochen nach Rekonstitution wurde den Chimären Blut abgenommen und seine Serum-Bestandteile auf natürliche IgM (A) und natürliche IgG (B) Antikörper untersucht. Die Quadrate des Scatter-Diagramms repräsentieren jeweils den Ak-Titer einer Maus. Relative Titer wurden ermittelt durch den Vergleich der konzentrationsabhängigen Extinktionskurven (ermittelt bei 405 nm) der einzelnen Seren in Bezug zu einem geeichten Serum. Repräsentative Daten aus 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels ELISA.

4.2.2.2 Antigen spezifische IgM-Antworten in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären sind nach primärer und sekundärer Immunisierung erhöht

Nach primärer Immunisierung der Chimären mit DNP-KLH (150 µg) in Alum wurden eine und drei Wochen nach Immunisierung Seren der Tiere aus der Schwanzvene gewonnen (3.2.14.). In einem DNP spezifischen ELISA wurden die relativen Titer der verschiedenen Immunoglobuline bestimmt (3.2.15.). Dabei diente ein geeichtes Serum als Bezugspunkt, zu welchem die Extinktionskurven der Seren in Beziehung gesetzt wurden. Eine Negativkontrolle, Serum eines nicht immunisierten Tieres, wurde ebenfalls in jedem Test mitgeführt (3.2.15). Die ersten Antikörper in einer adaptiven Immunantwort sind Antikörper der Subklasse IgM. Diese wurden zunächst untersucht. Die Mittelwerte der relativen Titer der IgM-Antworten am Tag sieben nach Immunisierung sind mit $0,94 \pm 0,43$ signifikant erhöht in den Chimären, in denen alle B-Zellen CTLA-4 defizient sind, gegenüber den Titern der Chimären der CTLA-4 kompetenten B-Zellen mit $0,59 \pm 0,29$. Eine signifikante Erhöhung der Antikörperproduktion des IgM Typs in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber den CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären war ebenfalls drei Wochen nach Primärimmunisierung detektierbar (Abb.22 oben).

Im Verlauf der Immunantwort kommt es zum Isotypklassenwechsel, bei dem der konstante Teil eines Antikörpers wechselt. So wurden auch DNP spezifische Antikörper in den Chimären der IgG-Klasse, IgG1 und IgG2a, sowie IgE im ELISA untersucht. Die DNP spezifische IgG1 und IgG2a Antikörperantworten unterschieden sich in beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt. Eine Woche nach Immunisierung unterschieden sich die relativen Titer der DNP spezifischen IgE Antwort der beiden Chimären Gruppen nicht (Abb.22 unten). Drei Wochen nach primärer Immunisierung wurden signifikant mehr Antikörper des IgE Typs in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären detektiert.

Immunisiert man die Tiere ein zweites Mal, erhält man eine Sekundärantwort, welche hauptsächlich durch Gedächtniszellen und langlebige Plasmazellen, die während der Primärantwort entstanden sind, ausgeführt wird. Zwei Wochen nach Sekundärimmunisierung mit DNP-KLH (150 µg) ist der Mittelwert der IgM spezifischen Antikörperantworten der CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären mit $1,72 \pm 0,59$ fast doppelt so hoch wie der der CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären mit $1,02 \pm 0,37$. Dieser signifikante Unterschied der IgM Produktion konnte für die Produktion von IgG1, IgG2a und IgE der Mäuse aus beiden Chimären Gruppen nach zweiter Immunisierung nicht festgestellt werden (Abb.22). Diese Ergebnisse zeigen, dass CTLA-4 auf B-Zellen negativ regulatorisch vor allem in die IgM Produktion eingreift, aber auch die IgE Antikörperproduktion steuern kann.

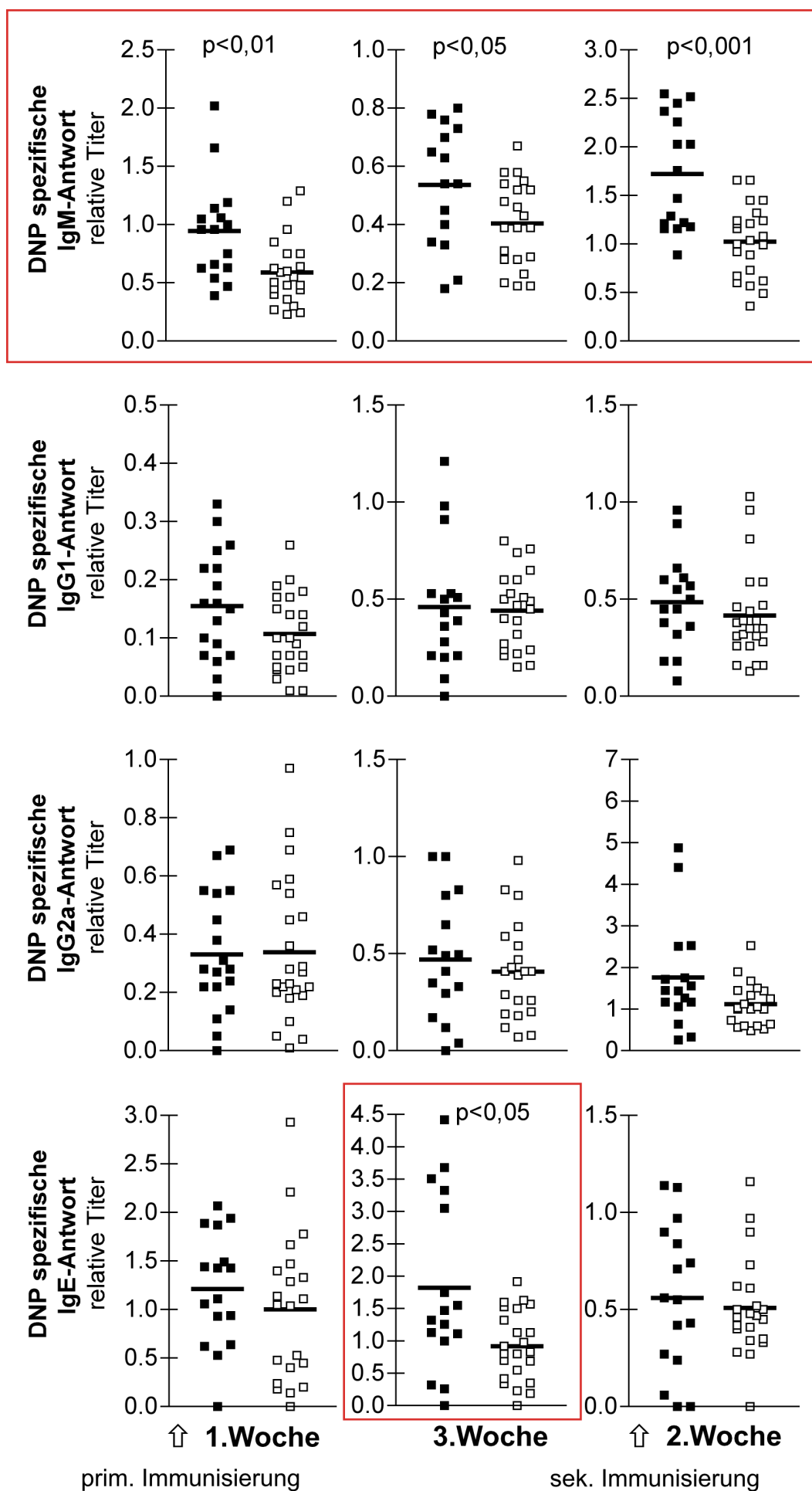


Abb. 22: Erhöhte DNP spezifische IgM Titer in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären nach primärer und sekundärer Immunisierung. C57BL/6 Tiere wurden bestrahlt und ein Tag später mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus C57BL/6 Tieren (= CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären □) bzw. mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären ■) i.v. rekonstituiert. 8,5 Wochen nach Rekonstitution wurden die Tiere mit 150 μ g DNP-KLH in Alum i.p. immunisiert und nach einer und drei Wochen DNP-spezifische Antikörper der Klassen IgM, IgG1, IgG2a und IgE analysiert. Sieben Wochen nach primärer Immunisierung erfolgte eine sekundäre Immunisierung mit DNP-KLH (150 μ g) und zwei Wochen danach wurden erneut DNP-spezifische Ak der einzelnen Klassen untersucht. Die Quadrate des Scatter-Diagramms repräsentieren jeweils den Ak-Titer aus dem Serum einer Maus. Relative Titer wurden ermittelt durch den Vergleich der konzentrationsabhängigen Extinktionskurven (ermittelt bei 405 nm) der einzelnen Seren in Bezug zu einem geeichten Serum. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden rot eingefasst, $p < 0,05$, $p < 0,01$. Die Datenreihen eines Scatter-Diagramms zeigen eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. Messung erfolgte mittels ELISA.

Die CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären (80% Zellen aus µMT C57BL/6 und 20% Zellen aus CTLA-4^{-/-} C57BL/6) sind zu 100% CTLA-4 defizient im B-Zellkompartiment, aber 20% der T-Zellen können ebenfalls kein CTLA-4 synthetisieren. Um die gewonnenen Ergebnisse des Effektes von CTLA-4 auf die Antikörperproduktion eindeutig den B-Zellen zuzuweisen, wurde eine dritte Chimären Gruppe hergestellt, welche in der Verteilung 80% Knochenmark aus C57BL/6 Tieren und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tieren rekonstituiert wurden. In diesen Chimären sind die B-Zellen zu 80% CTLA-4 kompetent und die T-Zellen zu 20% nicht in der Lage CTLA-4 zu synthetisieren. Im Weiteren wurden diese 20% CTLA-4^{-/-} T- und B-Zellen Chimären mit den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären verglichen. Die natürlichen Antikörpermengen des IgM Typs vor der Immunisierung waren in beiden Gruppen gleich (Abb.23A). Die 20% CTLA-4^{-/-} T- und B-Zellen Chimären wurden ebenfalls dem Immunisierungsprotokoll mit DNP-KLH in Alum und einer Sekundärimmunisierung mit DNP-KLH unterzogen. Die Ergebnisse in Abb.23B zeigen, dass die DNP spezifische IgM Antikörperproduktion dieser Chimären Gruppe signifikant erniedrigt gegenüber den IgM Ak aus der CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären Gruppe ist. Diese Ergebnisse dokumentieren, dass die erhöhten IgM Titer in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären nicht durch die 20% T-Zellen verursacht werden, welche ebenfalls CTLA-4 defizient sind.

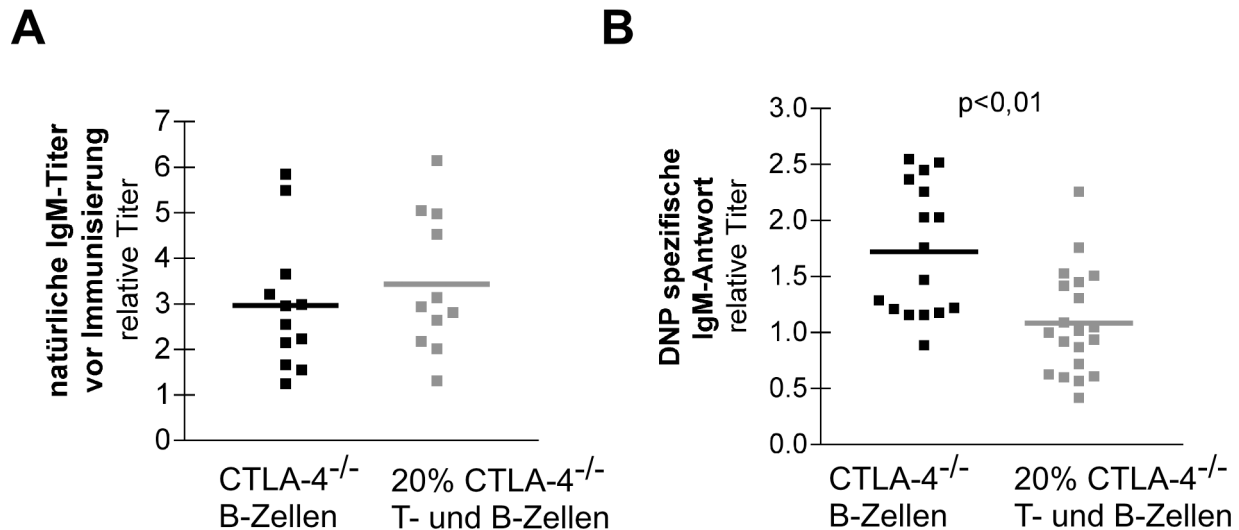


Abb. 23: Erhöhte IgM Antwort in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären wird nicht durch CTLA-4^{-/-} T-Zellen kontrolliert. C57BL/6 Tiere wurden bestrahlt und 1 Tag später mit 80% Knochenmark aus C57BL/6 und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= 20% CTLA-4^{-/-} T- und B-Zellen Chimären ■) bzw. mit 80% Knochenmark aus μ MT-Mäusen und 20% Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren (= CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären ■) i.v. rekonstituiert. **A)** Acht Wochen nach Rekonstitution wurde den Chimären Blut abgenommen und seine Serum-Bestandteile auf natürliche IgM Antikörper untersucht. Die Quadrate des Scatter-Diagramms repräsentieren jeweils den Ak-Titer einer Maus. Relative Titer wurden ermittelt durch den Vergleich der konzentrationsabhängigen Extinktionskurven (ermittelt bei 405 nm) der einzelnen Seren in Bezug zu einem geeichten Serum. Repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Messung erfolgte mittels ELISA. **B)** 8,5 Wochen nach Rekonstitution wurden die Tiere mit 150 μ g DNP-KLH in Alum i.p. immunisiert. Sieben Wochen nach primärer Immunisierung erfolgte eine sekundäre Immunisierung mit DNP-KLH und 2 Wochen danach wurden DNP-spezifische IgM Ak untersucht. Relative Titer wurden ermittelt durch den Vergleich der konzentrationsabhängigen Extinktionskurven (ermittelt bei 405 nm) der einzelnen Seren in Bezug zu einem geeichten Serum. p<0,01 Die Datenreihen eines Scatter-Diagramms zeigen eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. Messung erfolgte mittels ELISA.

5 Diskussion

5.1 Einfluss regulatorischer Zellen auf die Remission und den Krankheitsverlauf von R-EAE

Das Immunsystem ist ein effektives System zur Bekämpfung von pathogenen Erregern aus der Umwelt. Einmal begonnene Immunantworten bedürfen einer Abschaltung zum richtigen Zeitpunkt, um chronische, unerwünschte Immunantworten zu verhindern. Diese Abschaltung ist komplex reguliert und schließt viele Vorgänge, spezifische Moleküle und spezialisierte Immunzellen ein. Das kostimulatorische Molekül CTLA-4 reguliert Immunantworten, indem es die Effektorfunktionen von T-Zellen kontrolliert.

Die Zellen des Immunsystems können sich bei Fehlregulation gegen körpereigene Strukturen richten und dabei eine Vielzahl von Krankheiten induzieren, welche als Autoimmunkrankheiten bezeichnet werden. Diese Autoimmunkrankheiten treten oft in Schüben auf, lassen sich in Phasen der Remission (Verbesserung der Krankheit) und Phasen des Rezidivs (Krankheitsschub) unterteilen. Wie es zur Remission kommt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Remission der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose könnte durch CTLA-4 gesteuert werden. Dafür gibt es bereits erste Hinweise, indem α CTLA-4 Ak Gabe in Mäusen den Krankheitsverlauf und die Remission der EAE verändert. Dabei ist noch unklar, auf welchen Zellen der Antikörper während der EAE bindet und welche Zellpopulationen an der Regulation der Remission beteiligt sind. Der Einfluss regulatorischer T-Zellen, die CTLA-4 exprimieren, in Immunantworten und besonders in Autoimmunantworten wie z.B. R-EAE ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.1.1 Zellzusammensetzung in früher Phase der EAE – die Bedeutung von CTLA-4⁺ T-Zellen

Im ZNS von Mäusen mit EAE konnten wir eindeutig CD4⁺ T-Zellen, die gleichzeitig Oberflächen CTLA-4 positiv sind, identifizieren (Abb.5). Zur Identifizierung von Oberflächen CTLA-4 auf Einzelzellebene wurde die Liposomenmethode angewandt, welche sich zur Markierung von Oberflächen CTLA-4⁺ Zellen *in vitro* bereits bewährt hat [72, 73]. Dabei wurde festgestellt, dass der Prozentsatz mit 15% CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen im Gehirn zum Zeitpunkt der akuten Phase am höchsten war (Abb.5). Während der ersten Remission konnten nur maximal 5% CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen im ZNS detektiert werden

(Abb.5). Versuche, CTLA-4 positive Zellen im Zentralnervensystem von Mäusen mit EAE nachzuweisen, zeigen lediglich mRNA oder intrazelluläres CTLA-4 Protein auf undefinierten Zellen [62, 117, 164]. Da alle Antigen erfahrenen T-Zellen intrazellulär CTLA-4 exprimieren, sind die bisherigen Daten nicht aussagekräftig. Unsere Studien zeigen zum ersten Mal Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen am Entzündungsherd einer EAE. Eine Rolle von CTLA-4 für die Remission von EAE wurde bereits vermutet, ohne den Ort der Wirkung oder die genaue Zellpopulation CTLA-4⁺ Zellen in den Mäusen gekannt zu haben [95]. Die Funktion CTLA-4⁺ T-Zellen für den Verlauf der EAE konnte in dieser Arbeit noch nicht gezeigt werden: Da aber nur Oberflächen CTLA-4 funktionell relevant ist [72], könnten diese Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Regulation der Remission einer EAE leisten. Dafür spricht weiterhin die Tatsache, dass CTLA-4 ein primärer Terminator von T-Zellantworten ist und die Effektorfunktion regulatorischer T-Zellen steuern kann [24, 87, 88].

Der Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen am Entzündungsherd einer EAE der akuten Phase ist vergleichbar mit der maximalen Expression Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen einer *in vitro* restimulierten Antigen spezifischen Th1 Kultur [73]. Antigen spezifische Zellen werden am Entzündungsherd der EAE restimuliert, aber auch unspezifische Zellen werden ins ZNS rekrutiert [165]. So sind die 15% Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen im ZNS vermutlich nicht allein Antigen spezifische restimulierte Effektorzellen, sondern könnten auch aus Bystander aktivierten T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen zusammengesetzt sein. Letztere Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass es ca. 40% Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen im ZNS gibt, die nicht CD25 positiv sind (Daten nicht gezeigt). *In vitro* sind alle Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen auch positiv für CD25 [72], somit könnten die Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁻ Zellen aus dem ZNS ein drittes regulatorisches Kompartiment in Gehirnen von Mäusen mit EAE sein. Die zwei anderen regulatorischen Zellpopulationen, welche in dieser Arbeit im ZNS und Milzen EAE erkrankter Tiere identifiziert wurden, sind CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺CTLA-4⁺ T-Zellen (Abb.3). Foxp3 und CTLA-4 wurden in den beiden Populationen intrazellulär zytometrisch markiert. In weiteren Experimenten bedarf es einer zusätzlichen Analyse der Foxp3 Expression in den Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁻ Zellen, um deren regulatorisches Potential zu bestimmen. Kürzlich wurde gezeigt, dass Foxp3 Expression mit einer regulatorischen Aktivität korreliert, unabhängig von einer CD25 Expression auf der gleichen Zelle [27]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass verschiedene regulatorische Zellpopulationen

im ZNS von Mäusen mit EAE die Remission lokal vorantreiben und Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf nehmen.

Überraschenderweise führte ein Kotransfer von enzephalitogenen Lymphozyten zusammen mit Lymphozyten aus dem ZNS von Mäusen in Remission nicht zu einer Verhinderung der EAE bzw. zu einer Veränderung des EAE Verlaufs (Abb.4). Die Zellen aus der ersten Remission enthalten aber potentiell protektive CD25⁺, Foxp3⁺ und Oberflächen CTLA-4⁺ Zellen. Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis könnten zum einen eine zu geringe Zellzahl der Regulatoren sein. Das heißt, eine Anreicherung der regulatorischen Zellen aus allen CD4⁺ aus dem ZNS von Mäusen in Remission könnte die regulatorische Kapazität dieser Zellen zeigen. Weiterhin ist möglich, dass die Regulatoren aus der 1. Remission die bereits restimulierten enzephalitogenen Effektor-T-Zellen nicht kontrollieren können. Sind diese Regulatoren aber bereits zum Zeitpunkt der Restimulation der Effektorzellen im ZNS anwesend, können die Regulatoren vermutlich die Effektorzellen kontrollieren.

Ein weiterer Aspekt, wie CTLA-4 positive Zellen in das Geschehen der EAE eingreifen könnten, ist über die Regulation der Migration. In Tieren, in denen genetisch CTLA-4 inaktiviert wurde, konnten wir deutlich CD4⁺ T-Zellinfiltrate im Gehirn nachweisen, wobei dies in CTLA-4 kompetenten Tieren nicht der Fall war. Die CTLA-4^{-/-} C57BL/6 Tiere im Alter von ca. 4 Wochen, in denen CD4 Zellinfiltrate im Gehirn nachgewiesen wurden, zeigten aber keine Symptome einer EAE. Die infiltrierten Zellen sind wahrscheinlich TZR polyklonal und werden nicht mit Komponenten des Myelinsystems reaktiviert, um die Kaskade der Entzündung auszulösen. Die Expression von CTLA-4 kann diese Zellinfiltration der polyklonalen T-Zellen offensichtlich verhindern, denn CTLA-4^{+/+} C57BL/6 Tiere weisen keine T-Zellinfiltrate im Gehirn auf (Abb.6). Im Falle einer EAE, wo zunächst Antigen spezifische Zellen zum Entzündungsherd wandern, könnten Zellen, die ein CTLA-4 Signal bekamen, ins Gehirn gewandert sein und dort zu einer Häufung von Oberflächen CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen von 15% in der akuten Phase geführt haben. Einen vergleichbar hohen Prozentsatz CTLA-4⁺CD4⁺ Zellen gab es in keinem sekundär lymphatischen Organ zu einem der untersuchten Zeitpunkte. Eine Verstärkung der Antigen spezifischen Migration von CTLA-4⁺ Th1-Effektorzellen zum Entzündungsherd wird durch unveröffentlichte Daten (Knieke, persl. Kommunikation) unterstützt. Die CTLA-4 Expression könnte die Wanderung Antigen spezifischer Zellen ins Gehirn regulieren, wohingegen eine genetische Inaktivierung von CTLA-4 zu einer verstärkt Antigen unspezifischen T-Zellinfiltration ins Gehirn führt.

5.1.2 CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen in der frühen Phase der EAE

In dieser Arbeit wurde der funktionelle Einfluss von CD4⁺CD25⁺T_{reg} auf die Remission einer EAE in SJL/J Tieren untersucht, indem diese Zellen durch Depletion aus der Peripherie der Tiere entfernt wurden. Die Ergebnisse zeigten keine klinisch veränderte erste Remission in SJL/J Tieren nach Depletion der CD4⁺CD25⁺T_{reg} (Abb.8). Die Gründe dafür können nicht in fehlender suppressiver Aktivität der CD4⁺CD25⁺T_{reg} liegen, denn werden diese Zellen aus unbehandelten Mäusen angereichert, können sie naive T-Zellen *in vitro* supprimieren [135, 166].

Außerdem wurde ein Einfluss der CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen auf zellulärer Ebene während früher Phasen der EAE festgestellt, denn eine stärkere Th1-Antwort in von CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen depletierten Mäusen im Vergleich zu nicht depletierten Mäusen ist zu verzeichnen. In Tieren mit natürlichen CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen kommt es aber dennoch zu einer Immunreaktion. Bereits während der akuten Phase der EAE zeigten Zellen aus depletierten Tieren eine höhere Autoantigen spezifische TNF- α und IFN- γ Produktion im Vergleich zu Zellen aus nicht depletierten Tieren, obwohl der Krankheitsindex der untersuchten Tiere gleich war (Abb.8 und 10). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der klinische Verlauf auf zellulärer Ebene vor dem Erscheinen klinischer Symptome entschieden wird [167]. Es wurde gezeigt, dass MBP spezifische T-Zellen im Gehirn 3-4 Tage nach dem passiven Auslösen einer monophasischen EAE detektiert werden können, aber klinische Symptome erst nach weiteren 6 Tagen sichtbar wurden. Durch unsere Arbeit können diese Ergebnisse dahingehend erweitert werden, dass ein hoher klinischer Index zu Beginn der Krankheit keine Aussage über den weiteren Verlauf zulässt, aber die zelluläre Immunantwort ist bereits richtungsweisend. Es könnte sein, dass in Abwesenheit der CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen, Effektor-T-Zellen durch APZ stimuliert werden, wobei die Aktivität der APZ nicht durch T_{reg} Zellen kontrolliert wird, was zu einer stärkeren Aktivierung und/oder stärkeren Expansion der Effektorzellen führt [61]. Diese mögliche Funktionsweise CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen ist nicht für andere regulatorische Zellpopulationen, wie beispielsweise die durch diese Arbeit im ZNS von Mäusen mit EAE entdeckte CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺CTLA-4⁺ Zellpopulation, beschrieben. Das regulatorische Zellkompartiment der CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺CTLA-4⁺ Zellen, CD25⁻Foxp3⁺ Zellen sind potente Regulatoren [27, 168], könnte in CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen depletierten Mäusen immer noch regulierend in die erste Remission eingreifen. Berücksichtigt man allerdings die Tatsache, dass ein adoptiver Transfer von CD4⁺CD25⁻ Zellen, unter denen sich regulatorische CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Zellen befinden können, in Nude-Mäuse (haben keine B- und T-Zellen)

zu Autoimmunkrankheiten führt [17], scheint eine Regulation durch diese Zellpopulation unwahrscheinlich. Ebenso könnte aber auch die absolute Zahl dieser Zellen über deren mögliches regulatorisches Potential im ZNS der EAE Tiere entscheiden.

Andere Mechanismen zur Regulation der Remission einer EAE, wie beispielsweise die Induktion der Apoptose zur Abschaltung von Autoimmunantworten, sind möglich [125] [126]. Andere die Remission kontrollierende Zelltypen, wie zum Beispiel $CD8^+$ T-Zellen [131] und B-Zellen [50], wurden in verschiedenen Modellsystemen der EAE beschrieben. Diese Zellen konnten aber in Gehirnen von Mäusen zum Zeitpunkt der ersten Remission in SJL/J Mäusen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und sind daher vermutlich nicht an selbiger beteiligt. Andere bisher beschriebene Mechanismen zur Remission wurden in dieser Arbeit nicht analysiert. Neben der vermutlich wichtigen Rolle der regulatorischen T-Zellen für die Remission einer EAE wäre ein Zusammenspiel mit anderen Mechanismen denkbar.

Unsere Ergebnisse, dass die Depletion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen in SJL/J Mäusen vor EAE Induktion die klinischen Symptome zu Beginn der Krankheit nicht beeinflusst, stehen im Gegensatz zu einer Studie, welche beschreibt, dass eine Depletion der T_{reg} Zellen zum Tod von 85% der Versuchstiere führt und die restlichen Tiere keine Remission nach dem ersten Krankheitsschub haben [135]. Der größte Unterschied dieser Studie zu unserer experimentellen Anordnung liegt in der Nutzung von Pertussis Toxin zur Induktion von EAE, wobei wir nur mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ und CFA immunisierten. Des Weiteren haben wir die T_{reg} Zellen vor der Auslösung der EAE und nicht nach dem Auslösen der EAE depletiert. Pertussis Toxin begünstigt die Zerstörung der Blut-Hirnschranke und erleichtert damit den Eintritt von Zellen aus der Peripherie in das Zentralnervensystem [169]. Es gibt drei mögliche Wege, wie T-Zellen in das Gehirn einwandern können: Erstens über das Blut zum perivaskulären Raum über die Blut-Hirnschranke, zweitens über meningeale Gefäße in den Subarachnoidalraum und drittens über den Plexus choroideus in den Liquorraum [170]. Welcher dieser Wege während der pathophysiologischen Bedingungen im Falle einer MS/EAE von den Zellen genutzt wird, ist nicht bekannt, aber der Einsatz von Pertussis Toxin könnte einem dieser Wege den Vorrang geben und somit die Unterschiede zu unseren Daten erklären.

5.1.3 CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen in der späten Phase der EAE

Mäuse, in denen CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen depletiert wurden, zeigten deutlich erniedrigte sekundäre Remissionsraten, einhergehend mit CD4 Zellinfiltraten im Gehirn und erhöhter Antigen spezifischer Zytokinproduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.9 und 11). Wir (Daten nicht gezeigt) und andere [137, 147] zeigten, dass die CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen den Organismus drei Wochen nach Depletion zu 60-70% repopuliert haben. Diese Zellen können den Langzeit-Krankheitsverlauf aber nicht mehr beeinflussen, denn es kommt zur oben beschriebenen sekundär progressiven Verlaufsform. Die nach Depletion repopulierenden CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen konnten ebenfalls eine bereits bestehende autoimmune Gastritis nicht mehr kontrollieren [147]. Daten für ein monophasisches EAE Modell zeigen, dass Depletion von CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen vor und eine Woche nach der Induktion von EAE zu höheren Krankheitsindizes in den Tieren führt [137]. Diese zweite Depletion könnte neu entstandene CD25⁺T_{reg} Zellen aber auch Effektor-T-Zellen, welche durch Aktivierung CD25 exprimieren, entfernen. Die Krankheit verschlimmert sich nach der zweiten Depletion aber noch einmal, was für die Depletion von neuen CD25⁺T_{reg} Zellen spricht. Diese sind dann vermutlich adaptive Regulatoren, welche während inflammatorischer Autoimmunantworten entstehen können [171].

Da die nach 3-4 Wochen repopulierten T_{reg} Zellen die etablierte EAE nicht kontrollieren können (Abb.9), müssen die T_{reg} Zellen vermutlich während der Initiationsphase der EAE vor Ort sein und können so den weiteren Verlauf der Krankheit dahingehend kontrollieren, dass es nicht zu einer sekundär progressiven Verlaufsform kommt.

Bisher ist unklar, an welcher Stelle T_{reg} Zellen regulierend eingreifen, aber i.v. injizierte CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen konnten nicht aus Gehirnen von Mäusen mit monophasischer EAE isoliert werden, obwohl sie den Krankheitsverlauf minderten [136]. Im Gegensatz dazu wurden CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen in einer Studie zur Kollagen-induzierten Arthritis und einer zweiten Studie zu entzündlichen Darmerkrankungen am Entzündungsort gefunden und konnten in situ supprimieren [140, 172]. In dieser Doktorarbeit konnten regulatorische T-Zellen am Ort der Entzündung, dem Gehirn, identifiziert werden. Daher nehmen wir an, dass sie dort die Effektorzellen der EAE kontrollieren.

Ob diese Zellen das ZNS aus der Peripherie infiltrierten oder aber am Entzündungsort entstanden sind, bleibt zu erforschen. CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺T_{reg} Zellen könnten das ZNS infiltriert haben, denn diese Zellen kommen aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Thymus, von wo sie über das Blut auf gleichem Weg wie Effektor-T-Zellen an ihren Bestimmungsort gewandert sein könnten. Die andere regulatorische Subpopulation, die

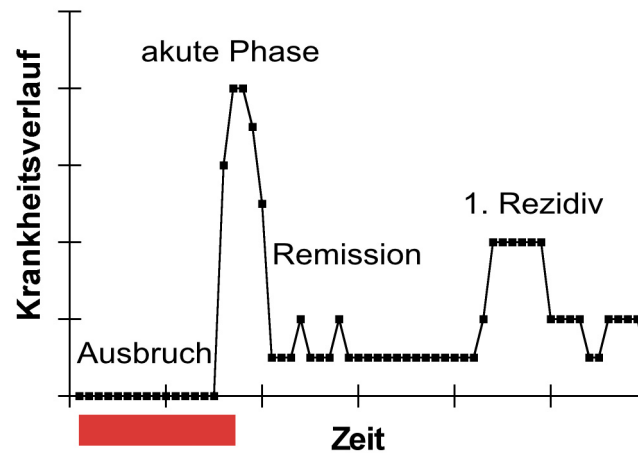
CD4⁺CD25⁻CTLA-4⁺Foxp3⁺ T_{reg} Zellen, könnte ebenfalls aus dem Thymus über die Peripherie ins ZNS gelangt sein. Diese sind möglicherweise im Thymus von CD4⁺CD25⁺, die ihr CD25 verloren haben, entstanden [19]. Der höhere Prozentsatz der CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen im ZNS im Vergleich zur Milz zum gleichen Zeitpunkt könnte durch eine Expansion dieser Zellen *in vivo* erklärbar sein [20], entgegen der Tatsache, dass diese Zellen *in vitro* anerg sind. Alternativ zum Modell der Einwanderung der T_{reg} Zellen aus der Peripherie, gibt es aber auch Studien, die zeigen, dass CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen aus naiven CD4⁺CD25⁻ Zellen durch Agonist-Peptid-Liganden [22] oder TGF-β in einem Asthma-Modell [23] während Immunantworten entstanden sind. Eine Umwandlung von CD4⁺CD25⁻ T_{reg} Zellen aus naiven CD4⁺CD25⁻ Zellen wird ebenfalls für möglich gehalten [19] und könnte auch für unser System zutreffen.

5.1.4 Sekundär progressive Verlaufsform der EAE wird durch CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen bereits zu Beginn der Krankheit bestimmt - Ausblick

Im späteren Verlauf der EAE konnten wir eine höhere Antigen spezifische IFN-γ und IL-2 Produktion der Milzzellen aus CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen depletierten Mäusen mit sekundär progressivem Krankheitsbild gegenüber Milzzellen aus nicht depletierten Tieren, die sich in Remission befanden, detektieren (Abb.11). Diese Daten demonstrieren, dass die Th1-Antwort, welche für die Immunpathologie der EAE verantwortlich ist [115], zumindest teilweise durch die CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen kontrolliert wird. Fehlen diese Zellen, ist die Th1-Antwort in den Tieren drastisch erhöht und keine anderen regulatorischen Mechanismen scheinen dieses Fehlen zu kompensieren, denn es kommt zu einer sekundär progressiven Verlaufsform.

CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen aus dem Blut von Patienten mit MS zeigen verminderte Effektor-Funktion abhängig vom Stimulus im *in vitro* Suppressions-Assay [173]. Ob diese Zellen eine Rolle für die Remission der MS spielen, wurde nicht untersucht. T_{reg} Zellen aus MS Patienten können aber *in vitro* immer noch regulatorisch wirken und MS Patienten zeigen oft einen mit Wechsel von Rezidiv und Remission verbundenen Krankheitsverlauf. Dies bringt uns zu der Vermutung, dass CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen die Immunpathologie der MS kontrollieren, zumindest verhindern sie einen sekundär progressiven Verlauf, was in unserem postulierten Modell dargestellt ist (Abb.24).

Wie und wann die in dieser Arbeit gefundenen regulatorischen Zellpopulationen ($CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA-4^+$ und $CD4^+CD25^-Foxp3^+CTLA-4^+$ und die Oberflächen $CTLA-4^+CD4^+$) genau auf den Krankheitsverlauf Einfluss nehmen, werden wir durch Anreicherung der einzelnen Populationen und Transfer Experimente in unbehandelte SJL/J Mäuse ermitteln.



Kontrolle der Immunantwort durch T_{reg} Zellen

Abb. 24: Modell: T_{reg} Zellen bestimmen bereits während der akuten Phase einer EAE den weiteren klinischen Verlauf.

Die EAE verläuft nach der ersten akuten Phase im Wechsel von Remission und Rezidiv. T_{reg} Zellen können bereits früh im Krankheitsverlauf Einfluss nehmen, indem sie 1. in der Peripherie bereits vor dem Ausbruch der Krankheit und während der akuten Phase am Entzündungsherd im ZNS lokalisieren und 2. die frühe enzephalitogene anti-inflammatorische Zytokinproduktion kontrollieren. Die frühe Einflussnahme der T_{reg} Zellen auf den Krankheitsverlauf zeigt sich zudem in der Verhinderung eines sekundär progressiven Krankheitsverlaufes, der sich in verringerten Remissionszahlen, CD4 Zell-infiltraten im Gehirn und erhöhter Zytokinproduktion in der späten Phase der EAE manifestiert.

5.2 CTLA-4 Expression in B-Zellen beeinflusst Thymus abhängige Immunantworten

CTLA-4 wird während adaptiver Immunantworten in T-Zellen exprimiert. Für einige Moleküle der großen Klasse der Kostimulatoren wurde die Zelllinien spezifische Expression in den letzten Jahren widerlegt. Im Zuge dieser Entwicklung gibt es erste Hinweise aus der Literatur, die eine Expression von CTLA-4 in B-Zellen beschreiben. Die genauen Umstände der Induktion, Expression und Funktion von CTLA-4 in B-Lymphozyten blieben bisher umstritten. Immunregulation kann neben T-Zellen auch von B-Zellen erfolgen. Hierbei haben wir das aus T-Zellreaktionen bekannte Molekül CTLA-4 in B-Zellen in dieser Arbeit im Detail charakterisiert.

5.2.1 CTLA-4 Expression in B-Zellen ist T-Zellen abhängig

Die Expression von CTLA-4 in B-Zellen wurde für murine und humane Zellen vorgeschlagen [96, 97, 152]. Diskrepanz herrscht allerdings über die Bedingungen der Induktion von CTLA-4 in B-Zellen, und es gab bisher keine geeignete Methode zur Detektion von murinen Oberflächen CTLA-4⁺ B-Zellen. Zum einen wurde für murine und humane B-Zellen eine Induktion von CTLA-4 in angereicherten B-Zellen durch die Stimulation von CD40 unter Zugabe von IL-4 vorgeschlagen [97, 152]. Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Studie, in welcher eine von CD40 und IL-4 unabhängige aber von T-Zellen abhängige CTLA-4 Expression in humanen B-Zellen ermittelt wurde [96]. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass mittels MACS Technologie angereicherte B-Zellen (Reinheit ca. 98%), die *in vitro* verschiedenen Stimuli ausgesetzt waren, kein CTLA-4 Protein exprimieren (Abb.12A). Im Gegensatz dazu konnten wir CTLA-4 in B-Zellen in Kulturen mit aktivierten T-Zellen nachweisen (Abb.12B). Die in unseren Studien ermittelte T-Zellabhängige Expression von murinem CTLA-4 in primären B-Zellen entspricht früheren Daten für humane B-Zellen [96]. Die Expression von CTLA-4 in B-Zellen erfolgt erst nach Aktivierung der Zellen, die maximale Expression von 15-20% CTLA-4⁺CD19⁺ Zellen liegt zwischen 48-72h nach Stimulationsbeginn und fällt danach wieder ab (Abb.13). An Tag 5 nach Stimulation ist die intrazelluläre CTLA-4 Expression kaum noch nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Oberflächen CTLA-4 ist in murinen Zellen aufgrund seiner geringen Molekülanzahl mit konventioneller Fluoreszenz nicht detektierbar und konnte daher nicht überzeugend dargestellt werden [97]. Zur zytometrischen Detektion von CTLA-4 auf

CD19⁺ Zellen wurde daher die Liposomentechnik angewandt [72, 73]. Der Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺ B-Zellen unterschied sich mit maximal 15% nur unwesentlich von der intrazellulären Expression des Proteins in B-Zellen (Abb.16). Ähnliches wurde für die Expression von CTLA-4 in humanen B-Zellen beschrieben, wobei sich der Prozentsatz Oberflächen CTLA-4 exprimierender B-Zellen ebenfalls kaum von der Zahl intrazellulär exprimierender B-Zellen unterschied [100]. Dieses Expressionsprofil unterscheidet sich deutlich von dem der T-Zellen, in denen nach Antigen spezifischer Stimulation alle Zellen intrazellulär CTLA-4 exprimieren, auf der Zelloberfläche aber unabhängig vom Zeitpunkt der Messung maximal 12% der T-Zellen einer Primärstimulation positiv für CTLA-4 sind [72]. So nehmen wir an, dass die Speicherung von intrazellulärem CTLA-4 in Vesikeln und der Transport an die Zelloberfläche nach Aktivierung der T-Zellen [81] verschieden ist bei B-Zellen, deren CTLA-4 Expression in der Zelle und auf der Zelloberfläche gleich ist.

Da die CTLA-4 Expression in B-Zellen T-Zellen abhängig ist, könnten diese B-Zellen zu den folliculären B-Zellen gehören, denn diese machen den größten Anteil der reifen B-Zellen aus und sie interagieren in Thymus abhängigen Immunantworten mit T-Zellen gleicher Spezifität [36]. Es stellt sich allerdings die Frage, warum nur max. ca. 10-15% der B-Zellen Oberflächen CTLA-4 exprimieren. Diese Zahl entspricht eher der Menge an Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen) innerhalb aller reifen B-Zellen der Milz. Marginalzonen B-Zellen sind wiederum in aller Regel eher in Thymus unabhängigen Immunantworten eingebunden [37]. Interessanterweise gibt es Hinweise über die Fähigkeit von Marginalzonen B-Zellen, ebenfalls in Thymus abhängige Immunantworten involviert zu sein, wobei die MZ B-Zellen hier vor allem in naiven CD4 T-Zellen eine starke Proliferation und Zytokinproduktion hervorrufen [174]. In dieser Doktorarbeit sind T-Zellen in den Kokulturen bereits Antigen erfahren (Th2 Effektor-Kulturen) bzw. stammen die T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen von Milzen, die auch aktivierte T-Zellen enthalten könnten, was eine Zugehörigkeit der CTLA-4 exprimierenden B-Zellen zu den MZ B-Zellen unwahrscheinlich macht. Spannend hierbei ist auch die Annahme, dass folliculäre B-Zellen zur Wandlung in Marginalzonen B-Zellen befähigt sind [36], ob dies in unseren Zellkultursystemen möglich war, wird noch analysiert werden. Die zur Expression von CTLA-4 befähigten B-Zellen könnten auch zu den B1-B-Zellen gehören. Da diese aber ähnlich den MZ B-Zellen an Thymus unabhängigen Immunantworten beteiligt sind und vor allem in der Pleura- und Peritonealhöhle und nicht in der Milz vorkommen, ist dies nach unseren Daten auszuschließen. Allerdings wurden in Menschen mit einer B-CLL (B-Zell chronischen lymphatischen Leukämie) bösartig transformierte CD5⁺CD19⁺ B-Zellen (B1-B-Zellen) gefunden, die eine hohe intrazelluläre CTLA-4 Expression zeigten [100]. Die

genaue Zugehörigkeit der CTLA-4⁺ B-Zellen zu einem der möglichen B-Zellsubtypen wird weiter charakterisiert werden.

Die B-Zellen in den von uns durchgeführten T-Zell-Kokulturen wurden vermutlich nicht über ihren BZR getriggert, fungierten aber als Antigen-präsentierende Zellen und wurden dadurch aktiviert. Nach Aktivierung induzierte Oberflächenmarker auf B-Zellen wurden untersucht und dabei zwischen Oberflächen CTLA-4⁻ im Vergleich zu Oberflächen CTLA-4⁺ B-Zellen unterschieden. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Expression von CD69, MHC und CD86 zwischen Oberflächen CTLA-4⁻ und Oberflächen CTLA-4⁺ B-Zellen (Abb.17). Da CTLA-4 erst im Zuge der Aktivierung (nach 48h) exprimiert wird, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CTLA-4 in B-Zellen, wie in T-Zellen [72], nicht in der Lage ist, eine bereits erfolgte Induktion der untersuchten Oberflächenrezeptoren rückgängig zu machen. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass CTLA-4 auf B-Zellen keinen Liganden in unseren Zellkultursystemen hatte. Dies ist vermutlich, wie in Abschnitt 5.2.3. näher herausgearbeitet wird, nicht der Fall.

5.2.2 5.2.2. CTLA-4 in B-Zellen entsteht aus zelleigener Synthese

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das CTLA-4 Protein in B-Zellen auf der Zelloberfläche und intrazellulär durchflusszytometrisch nachweisbar ist. Um auszuschließen, dass das CTLA-4 Protein durch Molekültransfer von aktivierten T-Zellen aufgenommen wurde, führten wir einen Nachweis der mRNA für CTLA-4 in B-Zellen durch. In T-Zell-Kokulturen konnten wir 24h nach Stimulationsbeginn die mRNA für CTLA-4 in B-Zellen detektieren (Abb.18). Diese mRNA und Proteindaten zeigen, dass B-Zellen CTLA-4 transkribieren, translatieren und auf die Zelloberfläche bringen.

Eine weitere Überlegung, die gegen eine Aufnahme des CTLA-4 Proteins aus T-Zellen spricht, ist der Prozentsatz Oberflächen CTLA-4⁺ B- und T-Zellen in den Kulturen. In den von uns genutzten Kulturen exprimierten die T-Zellen maximal 30% Oberflächen CTLA-4 und die B-Zellen max. 15% Oberflächen CTLA-4. Aufgrund des Verhältnisses von CTLA-4 auf B- und T-Zellen halten wir einen Transfer von CTLA-4 von T-Zellen auf B-Zellen für unwahrscheinlich. Molekültransfer von interagierenden Zellen ist für T-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen und B-Zellen beschrieben [156]. Vor allem für T-Zellen ist eine Aufnahme von B7-Molekülen und MHC Molekülen von Antigen präsentierenden Zellen gezeigt [158, 175]. Dieser Molekültransfer von Molekülen auf APZ hin zu T-Zellen ist in aller Regel unidirektional [176], was wiederum unsere Ergebnisse einer zelleigenen CTLA-4 Produktion in B-Zellen unterstützt.

Ein weiteres Experiment, in welchem wir CTLA-4^{+/+} B-Zellen zusammen mit CTLA-4^{-/-} B-Zellen und CTLA-4^{+/+} T-Zellen stimulierten, untermauert die Annahme der zelleigenen Synthese von CTLA-4 in B-Zellen. In den B-Zellen aus CTLA-4^{-/-} Tieren in diesen Kokulturen konnten wir kein CTLA-4 Protein nachweisen, also ist es nicht zu einem Molekültransfer von T-Zellen zu B-Zellen gekommen (Abb.15).

Die Zelllinienspezifität der Kostimulator Expression wurde durch vorangegangene Studien der letzten Jahre bereits in Frage gestellt. CD28 wird nicht nur auf T-Zellen exprimiert, sondern kann auf aktivierten B-Zellen [67] und Plasmazellen [68, 69] detektiert werden. Unsere Daten fügen das Molekül CTLA-4 hinzu, welches neben der Expression auf T-Zellen, auch auf aktivierten B-Zellen exprimiert wird.

5.2.3 Mögliche Interaktionspartner für Oberflächen CTLA-4 auf B-Zellen

In den von uns *in vitro* genutzten T-Zellabhängigen Kultursystemen, in denen CTLA-4 auf B-Zellen exprimiert wird, könnte dieses Molekül mit B7 auf dendritischen Zellen, Makrophagen oder mit B7 auf T-Zellen interagieren. Eine Expression von B7 auf T-Zellen in unseren Zellkultursystemen ist sehr wahrscheinlich, denn bereits *ex vivo* und nach CD3 bzw. Con A Stimulation gelang ein deutlicher Nachweis von B7-2 auf T-Zellen [177]. In anderen *in vitro* Studien konnte ebenfalls B7-2 auf T-Zellen nachgewiesen werden [63, 64]. Gleichfalls wurden *in vivo* B7-1 und B7-2 Moleküle auf T-Zellen aus Gehirnen von Mäusen mit EAE dokumentiert [62]. Die von T-Zellen exprimierten B7 Moleküle sind hierbei nicht nur Liganden, sondern leiten Signale in die Zellen weiter [66]. Das CTLA-4 Molekül auf B-Zellen könnte *in vivo* ebenfalls an B7 auf T-Zellen binden und durch Signalweiterleitung in beide Zellen würde es zur komplexen Immunregulation kommen.

Weiterhin gibt es Hinweise aus der Literatur, dass CTLA-4 nicht nur in Zellen der adaptiven Immunantwort, sondern auch in Zellen der angeborenen Immunität, z.B. Monozyten und Granulozyten, gebildet wird [178]. Diese Daten sind methodisch nicht überzeugend und nicht eindeutig. Ebenfalls stellt sich die Frage, wie CTLA-4 in diesem Fall aktiviert werden kann. Neben der möglichen Interaktion von CTLA-4 auf B-Zellen mit B7 Molekülen auf T-Zellen ist vorstellbar, dass das CTLA-4 Molekül auf B-Zellen mit B7 Molekülen auf anderen aktivierten B-Zellen in Interaktion treten kann [97, 179]. Das wäre beispielsweise in Thymus abhängigen Immunantworten möglich, indem die durch T-Zellen aktivierten B-Zellen, die jetzt auch CTLA-4 exprimieren können, nach Wanderung in die Follikel mit anderen B-Zellen in den B-Zellzonen der Keimzentren interagieren.

Für T-Zellen ist beschrieben, dass ein Mechanismus der Wirkung von CTLA-4 durch das Verdrängen von CD28 von den Liganden B7-1/B7-2 zustande kommt, denn CTLA-4^{-/-}

Tiere, die mit Zellen rekonstituiert wurden, in denen der zytoplasmatische Teil von CTLA-4 fehlt, sind von der lymphoproliferativen Krankheit geheilt [180]. Diese Funktionsweise von CTLA-4 scheint für CTLA-4 auf aktivierten B-Zellen, die kein CD28 haben, nicht möglich. Wäre allerdings CTLA-4 auch auf terminal differenzierten Plasmazellen detektierbar (erste Hinweise aus unserem Labor zeigen CTLA-4⁺ humane Plasmazellen), könnte ebenso eine Konkurrenz mit auf Plasmazellen detektierbarem CD28 [68, 69] um die Liganden B7-1/B7-2 existieren. Interessant ist hierbei auch die Tatsache, dass CD28 auf Plasmazellen nicht vor Apoptose schützt [69], so wie das für T-Zellen und seine CD28 Expression beschrieben ist [181]. Die Frage ist, welche Zellen dann die B7-Liganden für die Plasmazellen exprimieren können, möglicherweise die Stromazellen des Knochenmarks.

5.2.4 CTLA-4 Induktion durch CD19-Signale

In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die mRNA für CTLA-4 nicht in naiven B-Zellen nachweisbar ist. Dies steht im Kontrast zur mRNA in T-Zellen, welche in nicht-aktivierten T-Zellen bereits detektiert werden kann [70].

Wir konnten feststellen, dass eine Kreuzvernetzung von CD19 die Induktion von CTLA-4 mRNA in B-Zellen auslösen kann (Abb.19). Dies geschah durch eine Anreicherung von B-Zellen mit α CD19 magnetischen Mikropartikeln und MACS, aber auch durch α CD19 Ak, welche an Latexpartikel gekoppelt wurden und somit zur Kreuzvernetzung von CD19 Molekülen führten. Diese CTLA-4 mRNA wird nicht automatisch translatiert, denn in mit α CD19 magnetischen Mikropartikeln und MACS angereicherten B-Zellen kann nach α CD40 +IL-4 Behandlung kein CTLA-4 Protein nachgewiesen werden. Es scheint also ein 2. Signal für die Synthese des CTLA-4 Proteins notwendig zu sein. Da Heparansulfat, Heparin und IgM als Liganden von CD19 auf follikulären dendritischen Zellen (FDC) identifiziert wurden [182], könnten reife CD19⁺ B-Zellen durch Kontakt mit den FDC *in vivo* CTLA-4 mRNA herstellen. Auf der Suche nach Antigen haben reife B-Zellen Kontakt mit FDC, von denen sie Überlebenssignale empfangen. Treffen diese B-Zellen dann auf Antigen, werden sie in der T-Zell-Zone festgehalten und es kommt zur Interaktion mit T-Zellen, die möglicherweise das 2. Signal zur Synthese von CTLA-4 Protein liefern.

In den von uns *in vitro* genutzten T-Zell-Kokulturen, wurden die B-Zellen vorher nicht mit α CD19 Latexpartikeln angereichert und auch kein α CD19 Ak eingesetzt. Möglicherweise kommt es in diesen Kulturen nicht durch Trigger von CD19 zur Synthese der mRNA von CTLA-4 in B-Zellen sondern durch andere Signale von T-Zellen. Es sei denn, T-Zellen exprimieren ein noch zu identifizierendes Molekül, was ebenfalls als CD19 Ligand

fungieren kann. Da aber auch Ligation von MHC II Molekülen den zytoplasmatische Teil von CD19 und CD22 tyrosinphosphoryliert [183], was wiederum zum Anschub mehrerer intrazellulärer Signalkaskaden führt, könnte es auch über diesen Weg zur Induktion von CTLA-4 mRNA in den T-Zell-Kokulturen gekommen sein. Signaltransduktion durch MHC II wird beispielsweise durch SEB, aber auch durch TCR Interaktion ausgelöst [184].

CD19 bildet innerhalb eines Komplexes mit CD21 und CD22 einen Korezeptor für den Antigenrezeptor der B-Zellen und erhöht im allg. die Sensitivität des BZR [185]. Vorläufige Daten dieser Doktorarbeit zeigen, dass BZR Vernetzung durch α IgM Ak allein nicht zur Induktion von CTLA-4 mRNA führt und dass eine Kombination aus α CD19 Ak und α IgM Ak das mRNA Signal für CTLA-4 nicht verstärken (Daten nicht gezeigt). Die Induktion der CTLA-4 mRNA in B-Zellen scheint also vom BZR Signal unabhängig zu sein. Ein ähnliches Phänomen konnte für die Aktivierung von Lck, Lyn und Phospholipase C_γ in T-Zellen gezeigt werden, welche durch Vernetzung vom Korezeptor CD4, ohne TZR Stimulus, ausgelöst wurde [186] [187]. Des Weiteren wird durch CD4 Aktivierung Lime phosphoryliert, was durch seine Konkurrenz mit CD4 um Lck, negativ regulatorisch wirkt [188]. Die CTLA-4 mRNA Induktion durch CD19 Aktivierung, könnte, wenn es im Anschluß zur Proteinexpression kommt, ebenfalls ein negativ regulatorischer Mechanismus sein und die CD19-vermittelte Aktivierung der Scr-Familie der Proteinkinasen steuern.

5.2.5 CTLA-4 auf B-Zellen reguliert die primäre und sekundäre IgM

Produktion während Thymus abhängiger Immunantworten *in vivo*

Nachdem eine T-Zellabhängige Expression von CTLA-4 in B-Zellen *in vitro* festgestellt wurde, untersuchten wir die Funktion von CTLA-4 in B-Zellen während Thymus abhängiger (TD) Immunantworten, ausgelöst durch DNP-KLH in Alum *in vivo*. Die TD Immunantwort wurde in Knochenmarkschimären ausgelöst, in denen durch die Kombination von Knochenmark aus B-Zelldefizienten Tieren mit Knochenmark aus CTLA-4^{-/-} Tieren nur CTLA-4 defiziente B-Zellen vorkommen. Die Analyse der Zellrekonstitution der Knochenmarkschimären ergab keine veränderten B- und T-Zellen Häufigkeiten im Blut der CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären im Vergleich zu den CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären (Abb.20). Im Folgenden beschriebene Effekte resultieren daher nicht aus Zellzahlunterschieden der beteiligten Immunzellen.

Zunächst wurden die, vor allem von B-1 B-Zellen produzierten, natürlichen Antikörper der Chimären-Mäuse untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Produktion der natürlichen IgM Antikörper und der IgG Ak zwischen den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären und

den CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären festgestellt werden (Abb.21). Somit ist anzunehmen, dass die Entwicklung der B1-B-Zellen nicht von der Fähigkeit der B-Zellen, CTLA-4 zu exprimieren, abhängt. Dies unterstützt die von uns generierten *in vitro* Daten über die T-Zellen Abhängigkeit der CTLA-4 Expression in B-Zellen, was eine Expression von CTLA-4 in B-1 B-Zellen unwahrscheinlich macht und dadurch in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären keine veränderte Produktion natürlicher Antikörper festzustellen ist.

Nach einer Thymus abhängigen Immunisierung treffen Antigen spezifische, meist follikuläre B-Zellen in der T-Zellzone (z.B. der Milz) auf bereits aktivierte Antigen spezifische T-Zellen. In dieser Phase interagieren beide Zellen miteinander und CTLA-4 könnte in B-Zellen hochreguliert werden. Sieben Tage nach der Thymus abhängigen Immunisierung der chimären Tiere fanden wir eine signifikant höhere DNP-spezifische IgM Produktion in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber den CTLA-4 kompetenten Tieren (Abb.22). Diese Antikörper des IgM Typs sind wahrscheinlich Antikörper geringer Affinität aus Plasmazellen der primären Foci, diese sind von Tag 2-8 nach TD Immunisierung sichtbar [37], und nicht aus Plasmazellen aus Keimzentrumsreaktionen, denn letztere geben erst ab ca. Tag 10 nach Immunisierung Antikörper in detektierbaren Mengen frei [37]. Im Anschluss an die erste Interaktion von T- und B-Zellen wandert ein Teil der B-Zellen aus, um die primären Foci zu bilden, die anderen B-Zellen wandern durch die T-Zellzone zu den Follikeln und bilden später zusammen mit T-Zellen die Keimzentren. Vielleicht wandern Antigen spezifische B-Zellen ohne CTLA-4 nicht effizient in die Follikel ein. CTLA-4 könnte daher die Zahl der B-Zellen in den primären Foci regulieren (Abb.25). Durch das Fehlen von CTLA-4 könnten mehr Zellen die primären Foci besiedeln. Dies wäre eine Erklärung für die höhere Anzahl an IgM Antikörpern in den primären Foci (Abb.22). Dies wird durch Daten von T-Zellen unterstützt, welche mit CTLA-4 spezifischer in entzündliche Gewebe einwandern (Knieke, persl. Kommunikation). Die Anzahl an B-Zellen, welche an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen, ließe sich durch Analyse der PNA⁺ B-Zellen herausfinden, denn diese sind ab Tag 6 nach Immunisierung bereits messbar. PNA ist ein Marker zur an der Keimzentrumsbildung teilnehmenden B-Zellidentifizierung [189]. Wenn es eine verminderte Wanderung der B-Zellen gäbe, beeinflusst dies aber nur unwesentlich die Produktion der einem Isotypklassenwechsel unterzogenen Antikörper aus den Keimzentrumsreaktionen, denn diese bleiben, vor allem bezogen auf die IgG Subklassen, gleich.

IgM Antikörper haben im Körper vor allem die Aufgabe, das Komplement-System der angeborenen Immunität zu aktivieren. Am Tag 7 nach Immunisierung wurden auch DNP-spezifische IgG1, IgG2a und IgE Antikörper, letztere in sehr geringen Mengen,

nachgewiesen, wobei aber keine Unterschiede zwischen den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären und den Kontrollen sichtbar wurden (Abb.22). Diese Antikörper wurden von Plasmazellen sezerniert, die bereits einen Isotypklassenwechsel vollzogen haben, wiederum vermutlich noch nicht aus Keimzentrums-Plasmazellen, denn es gibt Studien, die zeigen, dass 2-6 Tage nach TD Immunantworten bereits IgG Antikörper, die nicht aus Keimzentren stammen, in deutlichen Mengen detektierbar sind [189, 190, 191].

10-14 Tage nach Immunisierung ist der Peak der Keimzentrumsreaktion, woraufhin Plasmazellen und Gedächtniszellen dann das Keimzentrum verlassen [37]. Drei Wochen nach Immunisierung konnten wir immer noch Unterschiede in der Produktion DNP-spezifischer IgM Antikörper zwischen Chimären mit CTLA-4^{-/-} B-Zellen und Chimären mit CTLA-4^{+/+} B-Zellen feststellen (Abb.22). Diese IgM Antikörper könnten aus Keimzentrums-Plasmazellen, die keinen Isotypklassenwechsel vollzogen haben, stammen [192]. Andererseits könnten diese IgM Ak auch aus Plasmazellen der primären Foci kommen, wenn es sich um die langlebigen Plasmazellen aus den primären Foci handelt [193, 194], denn die Halbwertszeiten von Ak des IgM-Typs beträgt nur 2 Tage im Serum [195].

Zu einem der gemessenen Zeitpunkte, drei Wochen nach Immunisierung, stellten wir erhöhte DNP-spezifische IgE Antikörper in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären gegenüber den Kontrollen fest (Abb.22). DNP-spezifische IgE Antikörper infolge einer DNP-KLH Immunisierung wurden auch in anderen Studien detektiert [196, 197], wobei die Menge gegenüber IgG Antikörpern sehr gering war, denn IgE Antikörper sind vorrangig an Zelloberflächen gebunden. IgE Ak spielen oft eine Rolle bei asthmatischen Krankheiten und werden außerdem bei Parasiteninfektionen produziert [179]. Die vermehrte IgE Produktion in CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären könnte ein Hinweis auf einen weiteren CTLA-4 Regulationsmechanismus in B-Zellen der Keimzentren sein, im Gegensatz zur möglichen Regulation der B-Zellen durch CTLA-4 in den primären Foci (Abb.25). In *in vitro* Studien wurde bereits vorgeschlagen, dass CTLA-4 auf B-Zellen über Inaktivierung von STAT6 and NF-κB regulierend in den Isotypklassenwechsel zu IgE eingreifen kann [97, 152]. So könnte CTLA-4 Hochregulation in B-Zellen eine Rolle für die Thymus abhängige Produktion von IgM-Antikörpern aus primären Foci einnehmen und zusätzlich unter gewissen Bedingungen in Keimzentrumsreaktionen den Isotypklassenwechsel zu IgE steuern.

Des Weiteren untersuchten wir Gedächtnisantworten in den Thymus abhängigen Immunantworten, indem wir sieben Wochen nach einer primären Immunisierung eine zweite Immunisierung mit DNP-KLH vornahmen. Zwei Wochen nach der

Sekundärimmunisierung detektierten wir höhere DNP-spezifische IgM Antikörper Titer in den CTLA-4^{-/-} B-Zellen Chimären im Vergleich zu CTLA-4^{+/+} B-Zellen Chimären (Abb.22). Diese IgM Antikörper könnten aus neuen naiven B-Zellen stammen, die infolge der Immunisierung das erste Mal zu Plasmazellen differenzierten. Andererseits könnten diese Antikörper auch aus Gedächtniszellen der IgM Klasse aus der primären Immunisierung stammen, sowie die kürzlich identifizierten humanen Gedächtnis B-Zellen der IgM Klasse [198]. Möglicherweise stammen diese IgM Ak aber auch aus langlebigen Plasmazellen der Keimzentren der Primärimmunisierung, dann müssten diese Antikörper Kennzeichen somatischer Hypermutation aufweisen, wie dies für humane IgM Ak beschrieben wurde [199].

Interessant wäre es auch, Plasmazellen auf ihre CTLA-4 Expression (wir haben erste Hinweise im Labor für humane CTLA-4⁺ Plasmazellen) zu untersuchen, denn diese könnten über CTLA-4 Überlebenssignale bekommen und dadurch zu langlebige Plasmazellen werden, ähnlich den CTLA-4 exprimierenden T-Zellen, die der Apoptose entkommen können und eventuell zur Gedächtnisbildung beitragen [73].

5.2.6 Immunregulation der EAE durch CTLA-4 in B-Zellen – Ausblick

Es gibt zahlreiche Studien zur regulatorischen Wirkung von B-Zellen in chronischen Entzündungen und Fällen von Autoimmunkrankheiten [47, 50, 52]. Besonders hervorzuheben sind dabei die IL-10 produzierenden regulatorischen B-Zellen in Mausmodellen für chronische intestinale Entzündungen [47] und das Auftreten von regulatorischen B-Zellen in Mausmodellen für MS [50]. In einer Studie wurde entdeckt, dass IL-10 produzierende B-Zellen die Remission einer EAE regulieren [50]. Welche regulatorischen Oberflächenmoleküle auf B-Zellen hierbei eine Rolle spielen, ist gänzlich unbekannt. CTLA-4 wäre durch seine vielgezeigte regulatorische Rolle in T-Zellen ein geeigneter Kandidat.

Wir haben erste Hinweise, dass CTLA-4 auf B-Zellen den Verlauf einer EAE in einem monophasischen Modell in C57BL/6 Tieren beeinflussen kann. Diese Daten werden in weiteren Experimenten verifiziert. Durch Analyse der im Gehirn infiltrierten Zellen werden wir den Ort der B-Zellregulation bestimmen. Des Weiteren sind Analysen zur krankheitsspezifischen IgG2a Produktion der an EAE erkrankten Tiere geplant. Inwieweit CTLA-4 auf B-Zellen die regulatorisch wirkende IL-10 Produktion von B-Zellen beeinflusst, wird ebenfalls Gegenstand weiterer Experimente sein.

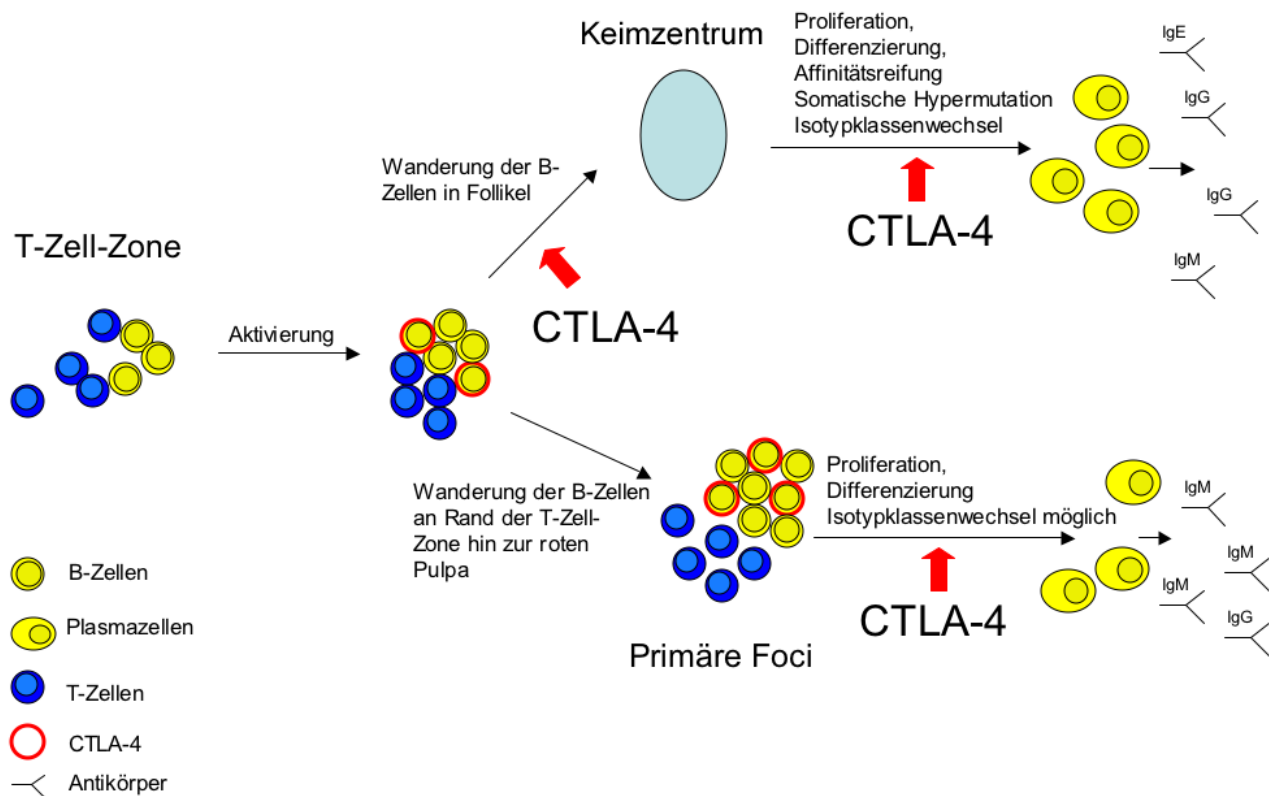


Abb. 25: Modell: Mögliche Kontrollpunkte für CTLA-4 auf B-Zellen während einer T h y m u s a b h ä n g i g e n I m m u n a n t w o r t .

Während T-Zellabhängiger Immunantworten treffen B- und T-Zellen in der T-Zellzone sekundär lymphatischer Organe aufeinander. Erkennen sie das gleiche Antigen, erfolgt eine Aktivierung der Zellen, wobei die B-Zelle zur Expression von CTLA-4 auf der Zelloberfläche stimuliert werden kann. Eine solche CTLA-4 Expression auf B-Zellen könnte dann das Migrationsverhalten der B-Zellen beeinflussen, indem mehr B-Zellen zu den Follikeln wandern, als zu den primären Foci und damit die IgM Produktion aus den primären Foci begrenzt wird. Zusätzlich könnte CTLA-4 auf B-Zellen die IgM Produktion in den primären Foci durch eine begrenzende Wirkung auf die Proliferation der B-Zellen oder durch eine Steuerung der Plasmazellüberlebensdauer kontrollieren. Neben der Rolle von CTLA-4 auf B-Zellen der primären Foci kann CTLA-4 auf B-Zellen auch die IgE Produktion der Plasmazellen aus den Keimzentren begrenzen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von regulatorischen Zellen auf den Verlauf einer EAE, die durch einen Wechsel von Remission und Rezidiv gekennzeichnet ist, über einen Zeitraum von 3 Monaten in SJL/J Tieren untersucht. Wir konnten unterschiedliche regulatorische Zellpopulationen im ZNS aus Mäusen während der akuten Phase und der ersten Remission einer EAE identifizieren. Neben den $CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA-4^+$ T-Zellen konnten wir ebenfalls $CD4^+CD25^-Foxp3^+CTLA-4^+$ T-Zellen in den das Gehirn infiltrierenden Lymphozyten Populationen zu verschiedenen Zeitpunkten einer EAE sichtbar machen. Wir fanden gleiche Zahlen an $CD4^+CD25^+$ Zellen, die auch intrazellulär CTLA-4 exprimierten, während der akuten Phase und ersten Remission, wobei aber Oberflächen $CTLA-4^+CD4^+$ Zellen während der akuten Phase deutlich erhöht waren. Die verschiedenen regulatorischen Subpopulationen am Entzündungsherd während einer EAE könnten auf unterschiedliche Weise in den weiteren Krankheitsverlauf Einfluss nehmen.

Eine Depletion der natürlich vorkommenden $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen vor dem Auslösen einer EAE führte zu einem schnelleren Krankheitsausbruch, schwererem Krankheitsverlauf und zu einem sekundär progressiven Verlauf, in dem weitere Remissionen in den Tieren deutlich vermindert waren. Interessanterweise war die erste Remission unabhängig von der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion. Obwohl die erste Remission von der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion unbeeinflusst blieb, konnten bereits im ersten Krankheitsschub signifikant erhöhte Antigen spezifische proinflammatorische Zytokine der T-Zellen detektiert werden. Damit wird deutlich, dass der sekundär progressive Verlauf durch $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zelldepletion bereits zeitig während des Krankheitsverlaufes eingeleitet wird.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind für das Feld der Immunregulation von entscheidender Bedeutung, denn wir konnten zeigen, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen den Verlauf chronischer Autoimmunkrankheiten modulieren können. Diese Zellen entscheiden bereits während des ersten klinischen Ausbruchs einer EAE über den Langzeitverlauf der Krankheit. Dies kann ein neuer interessanter therapeutischer Ansatz zur Behandlung von MS während früher Phasen der Krankheit sein.

Immunregulation kann ebenfalls durch B-Zellen erfolgen, wobei wir eines der für die Regulation möglicherweise verantwortlichen Moleküle, CTLA-4, in B-Zellen nachweisen konnten. Die Expression von intrazellulärem und Oberflächen CTLA-4 in aktivierten

B-Zellen ist strikt T-Zellen abhängig und hat ihr Maximum 48-72h nach Stimulation *in vitro*. Durch den Einsatz hochsensitiver Zellanreicherungsverfahren konnte der Nachweis der mRNA für CTLA-4 in den B-Zellen aus T-Zellabhängigen Zellkultursystemen erbracht werden. Die Induktion der mRNA für CTLA-4 kann unter bestimmten Umständen durch CD19 Kreuzvernetzung in B-Zellen erfolgen: Zur Expression des CTLA-4 Proteins bedarf es eines weiteren Signals aus T-Zellen, bei dem es sich nicht um CD40L und IL-4 handelt. Durch den Einsatz von Knochenmarkschimären, in denen CTLA-4 spezifisch nur in B-Zellen deletiert wird, konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 in B-Zellen die primäre IgE und IgM und die sekundäre IgM Produktion in Thymus abhängigen Immunantworten steuert. Die durch CTLA-4 gesteuerte IgM und IgE Produktion lässt vermuten, dass CTLA-4 die Entscheidung von B-Zellen, an Keimzentrumsreaktionen während Thymus abhängiger Immunreaktionen teilzunehmen und darüber hinaus im Keimzentrum selbst die Antikörperproduktion beeinflussen kann. Diese Daten implizieren für alle Thymus abhängigen Immunantworten eine noch komplexere Regulation, bei der CTLA-4 in B-Zellen deren Effektorfunktion intrinsisch modulieren kann, aber auch beispielsweise durch Interaktion und Einleitung einer Signalkaskade mit B7 Molekülen auf T-Zellen andere Immunzellen beeinflusst.

Unsere Daten zeigen, dass 1. bereits sehr früh durch immunregulatorische Mechanismen Immunantworten festgelegt werden und dass 2. die Zelllinien spezifische Expression für kostimulatorische Moleküle nicht mehr ausreichend die Vorgänge adaptiver Immunantworten beschreibt, denn CTLA-4 kann auf B-Zellen exprimiert werden und immunregulatorisch in T-Zellabhängige Immunantworten eingreifen.

Literatur

- [1] Ehrlich, P. (1910): Collected Studies on Immunity, J.Wiley & Sons, New York.
- [2] Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000): The immune system. Second of two parts, N Engl J Med (Band 343), Nr. 2, Seite 108-17. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10891520
- [3] Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000): The immune system. First of two parts, N Engl J Med (Band 343), Nr. 1, Seite 37-49. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10882768
- [4] Janeway, C.A., Jr.; Travers, P.; Walport, M. und Shlomchik, M.J. (2005): Immunobiology: the immune system in health and disease, Textbook, published by Garland Science Publishing (Band 6th edition).
- [5] Martin, C. H.; Aifantis, I.; Scimone, M. L.; von Andrian, U. H.; Reizis, B.; von Boehmer, H. und Gounari, F. (2003): Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential, Nat Immunol (Band 4), Nr. 9, Seite 866-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12925850
- [6] Nikolich-Zugich, J.; Slifka, M. K. und Messaoudi, I. (2004): The many important facets of T-cell repertoire diversity, Nat Rev Immunol (Band 4), Nr. 2, Seite 123-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15040585
- [7] Tze, L. E.; Schram, B. R.; Lam, K. P.; Hogquist, K. A.; Hippen, K. L.; Liu, J.; Shinton, S. A.; Otipoby, K. L.; Rodine, P. R.; Vegoe, A. L.; Kraus, M.; Hardy, R. R.; Schlissel, M. S.; Rajewsky, K. und Behrens, T. W. (2005): Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells, PLoS Biol (Band 3), Nr. 3, Seite e82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15752064
- [8] Bjorkman, P. J. (1997): MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions, Cell (Band 89), Nr. 2, Seite 167-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9108471
- [9] Kruisbeek, A. M. und Amsen, D. (1996): Mechanisms underlying T-cell tolerance, Curr Opin Immunol (Band 8), Nr. 2, Seite 233-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8725947
- [10] Chen, Y.; Inobe, J.; Marks, R.; Gonnella, P.; Kuchroo, V. K. und Weiner, H. L. (1995): Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance, Nature (Band 376), Nr. 6536, Seite 177-80. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7603570
- [11] Schwartz, R. H. (2003): T cell anergy, *Annu Rev Immunol* (Band 21), Seite 305-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12471050
- [12] Mowen, K. A. und Glimcher, L. H. (2004): Signaling pathways in Th2 development, *Immunol Rev* (Band 202), Seite 203-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15546395
- [13] Murphy, K. M. und Reiner, S. L. (2002): The lineage decisions of helper T cells, *Nat Rev Immunol* (Band 2), Nr. 12, Seite 933-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12461566
- [14] Crane, I. J. und Forrester, J. V. (2005): Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease, *Crit Rev Immunol* (Band 25), Nr. 2, Seite 75-102. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15952931
- [15] Simon, A. K.; Seipelt, E. und Sieper, J. (1994): Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 18, Seite 8562-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8078923
- [16] Gershon, R. K. und Kondo, K. (1971): Infectious immunological tolerance, *Immunology* (Band 21), Nr. 6, Seite 903-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4943147
- [17] Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. und Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J Immunol* (Band 155), Nr. 3, Seite 1151-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7636184
- [18] Maloy, K. J. und Powrie, F. (2001): Regulatory T cells in the control of immune pathology, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 9, Seite 816-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11526392
- [19] Sakaguchi, S. (2005): Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 4, Seite 345-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15785760

- [20] Fontenot, J. D. und Rudensky, A. Y. (2005): A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 4, Seite 331-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15785758
- [21] Asano, M.; Toda, M.; Sakaguchi, N. und Sakaguchi, S. (1996): Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation, *J Exp Med* (Band 184), Nr. 2, Seite 387-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8760792
- [22] Apostolou, I. und von Boehmer, H. (2004): In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells, *J Exp Med* (Band 199), Nr. 10, Seite 1401-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15148338
- [23] Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K. J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G. und Wahl, S. M. (2003): Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *J Exp Med* (Band 198), Nr. 12, Seite 1875-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676299
- [24] Takahashi, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Uede, T.; Shimizu, J.; Sakaguchi, N.; Mak, T. W. und Sakaguchi, S. (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 2, Seite 303-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10899917
- [25] von Boehmer, H. (2005): Mechanisms of suppression by suppressor T cells, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 4, Seite 338-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15785759
- [26] Ochs, H. D.; Ziegler, S. F. und Torgerson, T. R. (2005): FOXP3 acts as a rheostat of the immune response, *Immunol Rev* (Band 203), Seite 156-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15661028
- [27] Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Williams, L. M.; Dooley, J. L.; Farr, A. G. und Rudensky, A. Y. (2005): Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3, *Immunity* (Band 22), Nr. 3, Seite 329-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15780990
- [28] Grossman, W. J.; Verbsky, J. W.; Barchet, W.; Colonna, M.; Atkinson, J. P. und Ley, T. J. (2004): Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death, *Immunity* (Band 21), Nr. 4, Seite 589-601. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15485635

- [29] Sarween, N.; Chodos, A.; Raykundalia, C.; Khan, M.; Abbas, A. K. und Walker, L. S. (2004): CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion, *J Immunol* (Band 173), Nr. 5, Seite 2942-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15322152
- [30] de la Rosa, M.; Rutz, S.; Dorninger, H. und Scheffold, A. (2004): Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function, *Eur J Immunol* (Band 34), Nr. 9, Seite 2480-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15307180
- [31] Buer, J.; Lanoue, A.; Franzke, A.; Garcia, C.; von Boehmer, H. und Sarukhan, A. (1998): Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo, *J Exp Med* (Band 187), Nr. 2, Seite 177-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9432975
- [32] O'Garra, A. und Vieira, P. (2004): Regulatory T cells and mechanisms of immune system control, *Nat Med* (Band 10), Nr. 8, Seite 801-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286781
- [33] Riemekasten, G.; Langnickel, D.; Enghard, P.; Undeutsch, R.; Humrich, J.; Ebling, F. M.; Hoher, B.; Humaljoki, T.; Neumayer, H.; Burmester, G. R.; Hahn, B. H.; Radbruch, A. und Hiepe, F. (2004): Intravenous injection of a D1 protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells, *J Immunol* (Band 173), Nr. 9, Seite 5835-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15494537
- [34] Mosmann, T. R. und Sad, S. (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol Today* (Band 17), Nr. 3, Seite 138-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8820272
- [35] Hu, D.; Ikizawa, K.; Lu, L.; Sanchirico, M. E.; Shinohara, M. L. und Cantor, H. (2004): Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 5, Seite 516-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15098030
- [36] Matthias, P. und Rolink, A. G. (2005): Transcriptional networks in developing and mature B cells, *Nat Rev Immunol* (Band 5), Nr. 6, Seite 497-508. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15928681
- [37] Shapiro-Shelef, M. und Calame, K. (2005): Regulation of plasma-cell development, *Nat Rev Immunol* (Band 5), Nr. 3, Seite 230-42. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15738953

- [38] Hauser, A. E.; Muehlinghaus, G.; Manz, R. A.; Cassese, G.; Arce, S.; Debes, G. F.; Hamann, A.; Berek, C.; Lindenau, S.; Doerner, T.; Hiepe, F.; Odendahl, M.; Riemekasten, G.; Krenn, V. und Radbruch, A. (2003): Long-lived plasma cells in immunity and inflammation, *Ann N Y Acad Sci* (Band 987), Seite 266-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12727650
- [39] Boes, M.; Prodeus, A. P.; Schmidt, T.; Carroll, M. C. und Chen, J. (1998): A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 12, Seite 2381-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9858525
- [40] Avrameas, S. (1991): Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnosthi seauton', *Immunol Today* (Band 12), Nr. 5, Seite 154-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1715166
- [41] Stavnezer, J. (1996): Immunoglobulin class switching, *Curr Opin Immunol* (Band 8), Nr. 2, Seite 199-205. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8725943
- [42] Lorenz, M.; Jung, S. und Radbruch, A. (1995): How cytokines control immunoglobulin class switching, *Behring Inst Mitt*, Nr. 96, Seite 97-102. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7575358
- [43] Durie, F. H.; Foy, T. M.; Masters, S. R.; Laman, J. D. und Noelle, R. J. (1994): The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity, *Immunol Today* (Band 15), Nr. 9, Seite 406-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7524518
- [44] Litinskiy, M. B.; Nardelli, B.; Hilbert, D. M.; He, B.; Schaffer, A.; Casali, P. und Cerutti, A. (2002): DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 9, Seite 822-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12154359
- [45] Martin, F. und Chan, A. C. (2004): Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic, *Immunity* (Band 20), Nr. 5, Seite 517-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15142521
- [46] Takemura, S.; Klimiuk, P. A.; Braun, A.; Goronzy, J. J. und Weyand, C. M. (2001): T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent, *J Immunol* (Band 167), Nr. 8, Seite 4710-8. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11591802

- [47] Mizoguchi, A.; Mizoguchi, E.; Takedatsu, H.; Blumberg, R. S. und Bhan, A. K. (2002): Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity* (Band 16), Nr. 2, Seite 219-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11869683
- [48] Hobbs, M. V.; McEvilly, R. J.; Koch, R. J.; Cardenas, G. J. und Noonan, D. J. (1991): Interleukin-6 production by murine B cells and B cell lines, *Cell Immunol* (Band 132), Nr. 2, Seite 442-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1988162
- [49] Harris, D. P.; Haynes, L.; Sayles, P. C.; Duso, D. K.; Eaton, S. M.; Lepak, N. M.; Johnson, L. L.; Swain, S. L. und Lund, F. E. (2000): Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells, *Nat Immunol* (Band 1), Nr. 6, Seite 475-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11101868
- [50] Fillatreau, S.; Sweenie, C. H.; McGeachy, M. J.; Gray, D. und Anderton, S. M. (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 10, Seite 944-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12244307
- [51] Nagafuchi, H.; Suzuki, N.; Mizushima, Y. und Sakane, T. (1993): Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus, *J Immunol* (Band 151), Nr. 11, Seite 6525-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8245483
- [52] Mauri, C.; Gray, D.; Mushtaq, N. und Londei, M. (2003): Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells, *J Exp Med* (Band 197), Nr. 4, Seite 489-501. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12591906
- [53] Crow, M. K. (2004): Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions, *Rheum Dis Clin North Am* (Band 30), Nr. 1, Seite 175-91, vii-viii. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15061574
- [54] Frauwirth, K. A. und Thompson, C. B. (2002): Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation, *J Clin Invest* (Band 109), Nr. 3, Seite 295-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11827987

- [55] Hurwitz, A. A.; Kwon, E. D. und van Elsas, A. (2000): Costimulatory wars: the tumor menace, *Curr Opin Immunol* (Band 12), Nr. 5, Seite 589-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11007364
- [56] Greenwald, R. J.; Freeman, G. J. und Sharpe, A. H. (2005): The B7 family revisited, *Annu Rev Immunol* (Band 23), Seite 515-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771580
- [57] Lanzavecchia, A.; Lezzi, G. und Viola, A. (1999): From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior, *Cell* (Band 96), Nr. 1, Seite 1-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989490
- [58] Magott-Procelewska, M. (2004): Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells, *Ann Transplant* (Band 9), Nr. 3, Seite 13-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15759541
- [59] Podojil, J. R. und Sanders, V. M. (2003): Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation, *J Immunol* (Band 170), Nr. 10, Seite 5143-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12734361
- [60] Munn, D. H.; Sharma, M. D. und Mellor, A. L. (2004): Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells, *J Immunol* (Band 172), Nr. 7, Seite 4100-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15034022
- [61] Fallarino, F.; Grohmann, U.; Hwang, K. W.; Orabona, C.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Fioretti, M. C.; Alegre, M. L. und Puccetti, P. (2003): Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 12, Seite 1206-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14578884
- [62] Cross, A. H.; Lyons, J. A.; San, M.; Keeling, R. M.; Ku, G. und Racke, M. K. (1999): T cells are the main cell type expressing B7-1 and B7-2 in the central nervous system during acute, relapsing and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur J Immunol* (Band 29), Nr. 10, Seite 3140-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10540325>
- [63] Azuma, M.; Yssel, H.; Phillips, J. H.; Spits, H. und Lanier, L. L. (1993): Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes, *J Exp Med* (Band 177), Nr. 3, Seite 845-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7679711

- [64] Greenfield, E. A.; Howard, E.; Paradis, T.; Nguyen, K.; Benazzo, F.; McLean, P.; Hollsberg, P.; Davis, G.; Hafler, D. A.; Sharpe, A. H.; Freeman, G. J. und Kuchroo, V. K. (1997): B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA4 binding: implications for induction of antitumor immunity to T cell tumors, *J Immunol* (Band 158), Nr. 5, Seite 2025-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9036945
- [65] Taylor, P. A.; Lees, C. J.; Fournier, S.; Allison, J. P.; Sharpe, A. H. und Blazar, B. R. (2004): B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections], *J Immunol* (Band 172), Nr. 1, Seite 34-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14688306
- [66] Paust, S.; Lu, L.; McCarty, N. und Cantor, H. (2004): Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 28, Seite 10398-403. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15235129
- [67] Widney, D.; Boscardin, W. J.; Kasravi, A. und Martinez-Maza, O. (2003): Expression and function of CD28 on Epstein-Barr virus-positive B cell lines and AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma cell lines, *Tumour Biol* (Band 24), Nr. 2, Seite 82-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12853703
- [68] Kozbor, D.; Moretta, A.; Messner, H. A.; Moretta, L. und Croce, C. M. (1987): Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells, *J Immunol* (Band 138), Nr. 12, Seite 4128-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3035021
- [69] Zhang, X. G.; Olive, D.; Devos, J.; Rebouissou, C.; Ghiotto-Ragueneau, M.; Ferlin, M. und Klein, B. (1998): Malignant plasma cell lines express a functional CD28 molecule, *Leukemia* (Band 12), Nr. 4, Seite 610-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9557621
- [70] Brunner, M. C.; Chambers, C. A.; Chan, F. K.; Hanke, J.; Winoto, A. und Allison, J. P. (1999): CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation, *J Immunol* (Band 162), Nr. 10, Seite 5813-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229815
- [71] Lindsten, T.; Lee, K. P.; Harris, E. S.; Petryniak, B.; Craighead, N.; Reynolds, P. J.; Lombard, D. B.; Freeman, G. J.; Nadler, L. M.; Gray, G. S. und et al. (1993): Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells, *J Immunol* (Band 151), Nr. 7, Seite 3489-99. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8397258

- [72] Maszyna, F.; Hoff, H.; Kunkel, D.; Radbruch, A. und Brunner-Weinzierl, M. C. (2003): Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes, *J Immunol* (Band 171), Nr. 7, Seite 3459-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500641
- [73] Pandiyan, P.; Gartner, D.; Soezeri, O.; Radbruch, A.; Schulze-Osthoff, K. und Brunner-Weinzierl, M. C. (2004): CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function, *J Exp Med* (Band 199), Nr. 6, Seite 831-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15007096
- [74] Chambers, C. A.; Krummel, M. F.; Boitel, B.; Hurwitz, A.; Sullivan, T. J.; Fournier, S.; Cassell, D.; Brunner, M. und Allison, J. P. (1996): The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses, *Immunol Rev* (Band 153), Seite 27-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9010718
- [75] Chambers, C. A.; Kuhns, M. S.; Egen, J. G. und Allison, J. P. (2001): CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy, *Annu Rev Immunol* (Band 19), Seite 565-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11244047
- [76] Shiratori, T.; Miyatake, S.; Ohno, H.; Nakaseko, C.; Isono, K.; Bonifacino, J. S. und Saito, T. (1997): Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2, *Immunity* (Band 6), Nr. 5, Seite 583-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9175836
- [77] Chuang, E.; Alegre, M. L.; Duckett, C. S.; Noel, P. J.; Vander Heiden, M. G. und Thompson, C. B. (1997): Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression, *J Immunol* (Band 159), Nr. 1, Seite 144-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9200449
- [78] Lee, K. M.; Chuang, E.; Griffin, M.; Khattri, R.; Hong, D. K.; Zhang, W.; Straus, D.; Samelson, L. E.; Thompson, C. B. und Bluestone, J. A. (1998): Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4, *Science* (Band 282), Nr. 5397, Seite 2263-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9856951

- [79] Collins, A. V.; Brodie, D. W.; Gilbert, R. J.; Iaboni, A.; Manso-Sancho, R.; Walse, B.; Stuart, D. I.; van der Merwe, P. A. und Davis, S. J. (2002): The interaction properties of costimulatory molecules revisited, *Immunity* (Band 17), Nr. 2, Seite 201-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12196291
- [80] Stamper, C. C.; Zhang, Y.; Tobin, J. F.; Erbe, D. V.; Ikemizu, S.; Davis, S. J.; Stahl, M. L.; Seehra, J.; Somers, W. S. und Mosyak, L. (2001): Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses, *Nature* (Band 410), Nr. 6828, Seite 608-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11279502
- [81] Brunner-Weinzierl, M. C.; Hoff, H. und Burmester, G. R. (2004): Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases, *Arthritis Res Ther* (Band 6), Nr. 2, Seite 45-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15059264
- [82] Greenwald, R. J.; Oosterwegel, M. A.; van der Woude, D.; Kubal, A.; Mandelbrot, D. A.; Boussiotis, V. A. und Sharpe, A. H. (2002): CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response, *Eur J Immunol* (Band 32), Nr. 2, Seite 366-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11807776
- [83] Chen, W.; Jin, W. und Wahl, S. M. (1998): Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 10, Seite 1849-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9815262
- [84] Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P.; Thompson, C. B.; Griesser, H. und Mak, T. W. (1995): Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4, *Science* (Band 270), Nr. 5238, Seite 985-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7481803
- [85] Tivol, E. A.; Borriello, F.; Schweitzer, A. N.; Lynch, W. P.; Bluestone, J. A. und Sharpe, A. H. (1995): Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4, *Immunity* (Band 3), Nr. 5, Seite 541-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7584144
- [86] Bachmann, M. F.; Kohler, G.; Ecabert, B.; Mak, T. W. und Kopf, M. (1999): Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous, *J Immunol* (Band 163), Nr. 3, Seite 1128-31. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10415006

- [87] Manzotti, C. N.; Tipping, H.; Perry, L. C.; Mead, K. I.; Blair, P. J.; Zheng, Y. und Sansom, D. M. (2002): Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells, *Eur J Immunol* (Band 32), Nr. 10, Seite 2888-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12355442
- [88] Read, S.; Malmstrom, V. und Powrie, F. (2000): Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 2, Seite 295-302. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10899916
- [89] Maurer, M.; Ponath, A.; Kruse, N. und Rieckmann, P. (2002): CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* (Band 131), Nr. 1-2, Seite 213-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12458055
- [90] Ueda, H.; Howson, J. M.; Esposito, L.; Heward, J.; Snook, H.; Chamberlain, G.; Rainbow, D. B.; Hunter, K. M.; Smith, A. N.; Di Genova, G.; Herr, M. H.; Dahlman, I.; Payne, F.; Smyth, D.; Lowe, C.; Twells, R. C.; Howlett, S.; Healy, B.; Nutland, S.; Rance, H. E.; Everett, V.; Smink, L. J.; Lam, A. C.; Cordell, H. J.; Walker, N. M.; Bordin, C.; Hulme, J.; Motzo, C.; Cucca, F.; Hess, J. F.; Metzker, M. L.; Rogers, J.; Gregory, S.; Allahabadia, A.; Nithiyananthan, R.; Tuomilehto-Wolf, E.; Tuomilehto, J.; Bingley, P.; Gillespie, K. M.; Undlien, D. E.; Ronningen, K. S.; Guja, C.; Ionescu-Tirgoviste, C.; Savage, D. A.; Maxwell, A. P.; Carson, D. J.; Patterson, C. C.; Franklyn, J. A.; Clayton, D. G.; Peterson, L. B.; Wicker, L. S.; Todd, J. A. und Gough, S. C. (2003): Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease, *Nature* (Band 423), Nr. 6939, Seite 506-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12724780
- [91] Vijayakrishnan, L.; Slavik, J. M.; Illes, Z.; Greenwald, R. J.; Rainbow, D.; Greve, B.; Peterson, L. B.; Hafler, D. A.; Freeman, G. J.; Sharpe, A. H.; Wicker, L. S. und Kuchroo, V. K. (2004): An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells, *Immunity* (Band 20), Nr. 5, Seite 563-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15142525
- [92] McCoy, K.; Camberis, M. und Gros, G. L. (1997): Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade, *J Exp Med* (Band 186), Nr. 2, Seite 183-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9221747

- [93] Kwon, E. D.; Hurwitz, A. A.; Foster, B. A.; Madias, C.; Feldhaus, A. L.; Greenberg, N. M.; Burg, M. B. und Allison, J. P. (1997): Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 15, Seite 8099-103. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9223321
- [94] Hurwitz, A. A.; Sullivan, T. J.; Krummel, M. F.; Sobel, R. A. und Allison, J. P. (1997): Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis, *J Neuroimmunol* (Band 73), Nr. 1-2, Seite 57-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9058759
- [95] Karandikar, N. J.; Vanderlugt, C. L.; Walunas, T. L.; Miller, S. D. und Bluestone, J. A. (1996): CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease, *J Exp Med* (Band 184), Nr. 2, Seite 783-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8760834
- [96] Kuiper, H. M.; Brouwer, M.; Linsley, P. S. und van Lier, R. A. (1995): Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells, *J Immunol* (Band 155), Nr. 4, Seite 1776-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7543532
- [97] Pioli, C.; Gatta, L.; Ubaldi, V. und Doria, G. (2000): Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor, *J Immunol* (Band 165), Nr. 10, Seite 5530-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11067906
- [98] Xerri, L.; Devilard, E.; Hassoun, J.; Olive, D. und Birg, F. (1997): In vivo expression of the CTLA4 inhibitory receptor in malignant and reactive cells from human lymphomas, *J Pathol* (Band 183), Nr. 2, Seite 182-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9390031>
- [99] Raiter, A.; Novogrodsky, A. und Hardy, B. (1999): Activation of lymphocytes by BAT and anti CTLA-4: comparison of binding to T and B cells, *Immunol Lett* (Band 69), Nr. 2, Seite 247-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10482359>
- [100] Kosmaczewska, A.; Ciszak, L.; Suwalska, K.; Wolowiec, D. und Frydecka, I. (2005): CTLA-4 overexpression in CD19+/CD5+ cells correlates with the level of cell cycle regulators and disease progression in B-CLL patients, *Leukemia* (Band 19), Nr. 2, Seite 301-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549146
- [101] Zhang, J.; Markovic-Plese, S.; Lacet, B.; Raus, J.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1994): Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin

- basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, J Exp Med (Band 179), Nr. 3, Seite 973-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7509366
- [102] Markovic-Plese, S.; Fukaura, H.; Zhang, J.; al-Sabbagh, A.; Southwood, S.; Sette, A.; Kuchroo, V. K. und Hafler, D. A. (1995): T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans, J Immunol (Band 155), Nr. 2, Seite 982-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7541828
- [103] Ligiers, A.; Teleshova, N.; Masterman, T.; Huang, W. X. und Hillert, J. (2001): CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms, Genes Immun (Band 2), Nr. 3, Seite 145-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11426323
- [104] Hemmer, B.; Archelos, J. J. und Hartung, H. P. (2002): New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, Nat Rev Neurosci (Band 3), Nr. 4, Seite 291-301. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11967559
- [105] Prat, A. und Antel, J. (2005): Pathogenesis of multiple sclerosis, Curr Opin Neurol (Band 18), Nr. 3, Seite 225-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15891404
- [106] Lublin, F. D. und Reingold, S. C. (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, Neurology (Band 46), Nr. 4, Seite 907-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8780061
- [107] Kuhlmann, T.; Lingfeld, G.; Bitsch, A.; Schuchardt, J. und Bruck, W. (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time, Brain (Band 125), Nr. Pt 10, Seite 2202-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12244078
- [108] Gold, R.; C., Stadelmann; Linker, R.; Diem, R.; Bähr, M. und Brück, W. (2005): Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der multiplen Sklerose, Deutsches Ärzteblatt (Band 102), Nr. Heft 17, Seite 1204-10.
- [109] Brown, A. M. und McFarlin, D. E. (1981): Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse, Lab Invest (Band 45), Nr. 3, Seite 278-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6792424

- [110] Skundric, D. S. (2005): Experimental models of relapsing-remitting multiple sclerosis: current concepts and perspective, *Curr Neurovasc Res* (Band 2), Nr. 4, Seite 349-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16181126
- [111] Fazekas, G. und Tabira, T. (2000): What transgenic and knockout mouse models teach us about experimental autoimmune encephalomyelitis, *Rev Immunogenet* (Band 2), Nr. 1, Seite 115-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11324684
- [112] Miller, S. D. und Karpus, W.J. (1994): Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse, *Current Protocols in Immunology* (Band 3), Seite 15.1.1-13.
- [113] Anderson, A. C.; Nicholson, L. B.; Legge, K. L.; Turchin, V.; Zaghouani, H. und Kuchroo, V. K. (2000): High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 5, Seite 761-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10704458
- [114] Aloisi, F.; Ria, F. und Adorini, L. (2000): Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes, *Immunol Today* (Band 21), Nr. 3, Seite 141-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10689302
- [115] Kuchroo, V. K.; Anderson, A. C.; Waldner, H.; Munder, M.; Bettelli, E. und Nicholson, L. B. (2002): T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire, *Annu Rev Immunol* (Band 20), Seite 101-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11861599
- [116] Begolka, W. S.; Vanderlugt, C. L.; Rahbe, S. M. und Miller, S. D. (1998): Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis, *J Immunol* (Band 161), Nr. 8, Seite 4437-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9780223
- [117] Issazadeh, S.; Navikas, V.; Schaub, M.; Sayegh, M. und Khoury, S. (1998): Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo, *J Immunol* (Band 161), Nr. 3, Seite 1104-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9686568
- [118] Martin, R. und McFarland, H. F. (1995): Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Crit Rev Clin Lab Sci* (Band 32),

Nr. 2, Seite 121-82. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7598789

- [119] Tuohy, V. K.; Yu, M.; Yin, L.; Kawczak, J. A.; Johnson, J. M.; Mathisen, P. M.; Weinstock-Guttman, B. und Kinkel, R. P. (1998): The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Immunol Rev* (Band 164), Seite 93-100. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9795767>
- [120] Lehmann, P. V.; Targoni, O. S. und Forsthuber, T. G. (1998): Shifting T-cell activation thresholds in autoimmunity and determinant spreading, *Immunol Rev* (Band 164), Seite 53-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9795763>
- [121] Sercarz, E. E. (2000): Driver clones and determinant spreading, *J Autoimmun* (Band 14), Nr. 4, Seite 275-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10882052
- [122] Vandenbark, A. A.; Vainiene, M.; Arai, K.; Miller, S. D. und Offner, H. (1996): Prevention and treatment of relapsing autoimmune encephalomyelitis with myelin peptide-coupled splenocytes, *J Neurosci Res* (Band 45), Nr. 4, Seite 430-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8872903
- [123] Takacs, K.; Chandler, P. und Altmann, D. M. (1997): Relapsing and remitting experimental allergic encephalomyelitis: a focused response to the encephalitogenic peptide rather than epitope spread, *Eur J Immunol* (Band 27), Nr. 11, Seite 2927-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9394820
- [124] Jones, R. E.; Bourdette, D.; Moes, N.; Vandenbark, A.; Zamora, A. und Offner, H. (2003): Epitope spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* (Band 170), Nr. 4, Seite 1690-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12574332
- [125] Issazadeh, S.; Abdallah, K.; Chitnis, T.; Chandraker, A.; Wells, A. D.; Turka, L. A.; Sayegh, M. H. und Khoury, S. J. (2000): Role of passive T-cell death in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Clin Invest* (Band 105), Nr. 8, Seite 1109-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10772655
- [126] Suvannavejh, G. C.; Dal Canto, M. C.; Matis, L. A. und Miller, S. D. (2000): Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Clin Invest* (Band 105), Nr. 2, Seite 223-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10642601

- [127] Zhang, J.; Li, Y.; Cui, Y.; Chen, J.; Lu, M.; Elias, S. B. und Chopp, M. (2005): Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice, *Brain Res* (Band 1034), Nr. 1-2, Seite 34-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15713257
- [128] Juedes, A. E. und Ruddle, N. H. (2001): Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* (Band 166), Nr. 8, Seite 5168-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11290800
- [129] Gimsa, U.; Wolf, S. A.; Haas, D.; Bechmann, I. und Nitsch, R. (2001): Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain, *J Neuroimmunol* (Band 119), Nr. 1, Seite 73-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11525802
- [130] Garren, H.; Ruiz, P. J.; Watkins, T. A.; Fontoura, P.; Nguyen, L. T.; Estline, E. R.; Hirschberg, D. L. und Steinman, L. (2001): Combination of gene delivery and DNA vaccination to protect from and reverse Th1 autoimmune disease via deviation to the Th2 pathway, *Immunity* (Band 15), Nr. 1, Seite 15-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11485734
- [131] Jiang, H.; Braunstein, N. S.; Yu, B.; Winchester, R. und Chess, L. (2001): CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 11, Seite 6301-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11353822>
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/11/6301>
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/11/6301>
- [132] Furtado, G. C.; Olivares-Villagomez, D.; Curotto de Lafaille, M. A.; Wensky, A. K.; Latkowski, J. A. und Lafaille, J. J. (2001): Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis, *Immunol Rev* (Band 182), Seite 122-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722629
- [133] Hori, S.; Haury, M.; Coutinho, A. und Demengeot, J. (2002): Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 99), Nr. 12, Seite 8213-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12034883
- [134] Wing, K.; Lindgren, S.; Kollberg, G.; Lundgren, A.; Harris, R. A.; Rudin, A.; Lundin, S. und Suri-Payer, E. (2003): CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells, *Eur J Immunol* (Band 33), Nr. 3, Seite 579-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12616478

- [135] Zhang, X.; Koldzic, D. N.; Izikson, L.; Reddy, J.; Nazareno, R. F.; Sakaguchi, S.; Kuchroo, V. K. und Weiner, H. L. (2004): IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells, *Int Immunol* (Band 16), Nr. 2, Seite 249-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14734610
- [136] Kohm, A. P.; Carpentier, P. A.; Anger, H. A. und Miller, S. D. (2002): Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* (Band 169), Nr. 9, Seite 4712-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12391178
- [137] Montero, E.; Nussbaum, G.; Kaye, J. F.; Perez, R.; Lage, A.; Ben-Nun, A. und Cohen, I. R. (2004): Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies, *J Autoimmun* (Band 23), Nr. 1, Seite 1-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15236747
- [138] Sundstedt, A.; O'Neill, E. J.; Nicolson, K. S. und Wraith, D. C. (2003): Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo, *J Immunol* (Band 170), Nr. 3, Seite 1240-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12538682
- [139] Jaeckel, E.; von Boehmer, H. und Manns, M. P. (2005): Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes, *Diabetes* (Band 54), Nr. 2, Seite 306-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15591438
- [140] Mottet, C.; Uhlig, H. H. und Powrie, F. (2003): Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells, *J Immunol* (Band 170), Nr. 8, Seite 3939-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12682220
- [141] Egen, J. G.; Kuhns, M. S. und Allison, J. P. (2002): CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 7, Seite 611-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12087419
- [142] Murphy, K. M.; Heimberger, A. B. und Loh, D. Y. (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo, *Science* (Band 250), Nr. 4988, Seite 1720-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2125367
- [143] Chambers, C. A.; Cado, D.; Truong, T. und Allison, J. P. (1997): Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band

- 94), Nr. 17, Seite 9296-301. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9256476
- [144] Kitamura, D.; Roes, J.; Kuhn, R. und Rajewsky, K. (1991): A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene, *Nature* (Band 350), Nr. 6317, Seite 423-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1901381
- [145] Miltenyi, S.; Muller, W.; Weichel, W. und Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* (Band 11), Nr. 2, Seite 231-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1690625
- [146] Shevach, E. M. (1999): section: Induction of EAE, *Current Protocols in Immunology*.
- [147] McHugh, R. S. und Shevach, E. M. (2002): Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease, *J Immunol* (Band 168), Nr. 12, Seite 5979-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12055202
- [148] Tuohy, V. K.; Lu, Z.; Sobel, R. A.; Laursen, R. A. und Lees, M. B. (1989): Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice, *J Immunol* (Band 142), Nr. 5, Seite 1523-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2465343
- [149] Seddon, B. und Mason, D. (2000): The third function of the thymus, *Immunol Today* (Band 21), Nr. 2, Seite 95-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10652468
- [150] Boos, L.; Campbell, I. L.; Ames, R.; Wetsel, R. A. und Barnum, S. R. (2004): Deletion of the complement anaphylatoxin C3a receptor attenuates, whereas ectopic expression of C3a in the brain exacerbates, experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* (Band 173), Nr. 7, Seite 4708-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15383607
- [151] Serafini, B.; Columba-Cabezas, S.; Di Rosa, F. und Aloisi, F. (2000): Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Am J Pathol* (Band 157), Nr. 6, Seite 1991-2002. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11106572
- [152] Merlo, A.; Tenca, C.; Fais, F.; Battini, L.; Ciccone, E.; Grossi, C. E. und Saverino, D. (2005): Inhibitory receptors CD85j, LAIR-1, and CD152 down-regulate immunoglobulin and cytokine production by human B lymphocytes, *Clin Diagn Lab Immunol* (Band 12), Nr. 6, Seite 705-12. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15939744

- [153] Hurchla, M. A.; Sedy, J. R.; Gavrieli, M.; Drake, C. G.; Murphy, T. L. und Murphy, K. M. (2005): B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly Induced in anergic CD4+ T cells, J Immunol (Band 174), Nr. 6, Seite 3377-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15749870
- [154] Gajewska, M.; Rutkowski, R.; Lukasiewicz, D. und Wirth-Dzieciolowska, E. (2002): Differences between C57BL/6 and C57BL/10 inbred mouse strains in chromosomes 2,4,13,17 and 18*, Animal Science Paper and Reports (Band 20), Nr. 3, Seite 175-180.
- [155] Tam, P. E. und Messner, R. P. (1996): Genetic determinants of susceptibility to coxsackievirus B1-induced chronic inflammatory myopathy: effects of host background and major histocompatibility complex genes, J Lab Clin Med (Band 128), Nr. 3, Seite 279-89. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8783635
- [156] Sprent, J. (2005): Swapping molecules during cell-cell interactions, Sci STKE (Band 2005), Nr. 273, Seite pe8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15741541
- [157] Batista, F. D.; Iber, D. und Neuberger, M. S. (2001): B cells acquire antigen from target cells after synapse formation, Nature (Band 411), Nr. 6836, Seite 489-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11373683
- [158] Hwang, I.; Huang, J. F.; Kishimoto, H.; Brunmark, A.; Peterson, P. A.; Jackson, M. R.; Surh, C. D.; Cai, Z. und Sprent, J. (2000): T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells, J Exp Med (Band 191), Nr. 7, Seite 1137-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10748232
- [159] Huang, J. F.; Yang, Y.; Sepulveda, H.; Shi, W.; Hwang, I.; Peterson, P. A.; Jackson, M. R.; Sprent, J. und Cai, Z. (1999): TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells, Science (Band 286), Nr. 5441, Seite 952-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10542149
- [160] Brunet, J. F.; Denizot, F.; Luciani, M. F.; Roux-Dosseto, M.; Suzan, M.; Mattei, M. G. und Golstein, P. (1987): A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4, Nature (Band 328), Nr. 6127, Seite 267-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3496540

- [161] Horejsi, V.; Zhang, W. und Schraven, B. (2004): Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling, *Nat Rev Immunol* (Band 4), Nr. 8, Seite 603-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286727
- [162] Su, Y. W. und Jumaa, H. (2003): LAT links the pre-BCR to calcium signaling, *Immunity* (Band 19), Nr. 2, Seite 295-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12932362
- [163] Bot, A. (1996): Immunoglobulin deficient mice generated by gene targeting as models for studying the immune response, *Int Rev Immunol* (Band 13), Nr. 4, Seite 327-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8884429
- [164] Lyons, J. A.; Zhao, M. L. und Fritz, R. B. (1999): Pathogenesis of acute passive murine encephalomyelitis II. Th1 phenotype of the inducing population is not sufficient to cause disease, *J Neuroimmunol* (Band 93), Nr. 1-2, Seite 26-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10378866
- [165] Steinman, L. (1996): A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 6, Seite 2253-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8637858
- [166] Reddy, J.; Illes, Z.; Zhang, X.; Encinas, J.; Pyrdol, J.; Nicholson, L.; Sobel, R. A.; Wucherpfennig, K. W. und Kuchroo, V. K. (2004): Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 43, Seite 15434-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15492218
- [167] Flugel, A.; Berkowicz, T.; Ritter, T.; Labeur, M.; Jenne, D. E.; Li, Z.; Ellwart, J. W.; Willem, M.; Lassmann, H. und Wekerle, H. (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Immunity* (Band 14), Nr. 5, Seite 547-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11371357
- [168] Hori, S.; Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* (Band 299), Nr. 5609, Seite 1057-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12522256
- [169] Linthicum, D. S.; Munoz, J. J. und Blaskett, A. (1982): Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is

due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system, *Cell Immunol* (Band 73), Nr. 2, Seite 299-310. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6891621

- [170] Ransohoff, R. M.; Kivisakk, P. und Kidd, G. (2003): Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 7, Seite 569-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12876559
- [171] Bluestone, J. A. und Abbas, A. K. (2003): Natural versus adaptive regulatory T cells, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 3, Seite 253-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12658273
- [172] Morgan, M. E.; Flierman, R.; van Duivenvoorde, L. M.; Witteveen, H. J.; van Ewijk, W.; van Laar, J. M.; de Vries, R. R. und Toes, R. E. (2005): Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells, *Arthritis Rheum* (Band 52), Nr. 7, Seite 2212-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15986351
- [173] Viglietta, V.; Baecher-Allan, C.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis, *J Exp Med* (Band 199), Nr. 7, Seite 971-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15067033
- [174] Attanavanich, K. und Kearney, J. F. (2004): Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells, *J Immunol* (Band 172), Nr. 2, Seite 803-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14707050
- [175] Sabzevari, H.; Kantor, J.; Jaigirdar, A.; Tagaya, Y.; Naramura, M.; Hodge, J.; Bernon, J. und Schlom, J. (2001): Acquisition of CD80 (B7-1) by T cells, *J Immunol* (Band 166), Nr. 4, Seite 2505-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160311
- [176] Vanherberghen, B.; Andersson, K.; Carlin, L. M.; Nolte-'t Hoen, E. N.; Williams, G. S.; Hoglund, P. und Davis, D. M. (2004): Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 48, Seite 16873-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15550544
- [177] Hathcock, K. S.; Laszlo, G.; Pucillo, C.; Linsley, P. und Hodes, R. J. (1994): Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function, *J Exp Med* (Band 180), Nr. 2, Seite 631-40. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7519245

- [178] Pistillo, M. P.; Tazzari, P. L.; Palmisano, G. L.; Pierri, I.; Bolognesi, A.; Ferlito, F.; Capanni, P.; Polito, L.; Ratta, M.; Pileri, S.; Piccioli, M.; Basso, G.; Rissotto, L.; Conte, R.; Gobbi, M.; Stirpe, F. und Ferrara, G. B. (2003): CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells, *Blood* (Band 101), Nr. 1, Seite 202-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12393538
- [179] Geha, R. S.; Jabara, H. H. und Brodeur, S. R. (2003): The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 9, Seite 721-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12949496
- [180] Masteller, E. L.; Chuang, E.; Mullen, A. C.; Reiner, S. L. und Thompson, C. B. (2000): Structural analysis of CTLA-4 function in vivo, *J Immunol* (Band 164), Nr. 10, Seite 5319-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10799894
- [181] Boise, L. H.; Minn, A. J.; Noel, P. J.; June, C. H.; Accavitti, M. A.; Lindsten, T. und Thompson, C. B. (1995): CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL, *Immunity* (Band 3), Nr. 1, Seite 87-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7621080
- [182] de Fougères, A. R.; Batista, F.; Johnsson, E. und Fearon, D. T. (2001): IgM and stromal cell-associated heparan sulfate/heparin as complement-independent ligands for CD19, *Eur J Immunol* (Band 31), Nr. 7, Seite 2189-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11449373
- [183] Bobbitt, K. R. und Justement, L. B. (2000): Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22, *J Immunol* (Band 165), Nr. 10, Seite 5588-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11067914
- [184] Scholl, P. R. und Geha, R. S. (1994): MHC class II signaling in B-cell activation, *Immunol Today* (Band 15), Nr. 9, Seite 418-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7524519
- [185] Fearon, D. T. und Carter, R. H. (1995): The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity, *Annu Rev Immunol* (Band 13), Seite 127-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7542009

- [186] Milia, E.; Di Somma, M. M.; Majolini, M. B.; Ulivieri, C.; Somma, F.; Piccolella, E.; Telford, J. L. und Baldari, C. T. (1997): Gene activating and proapoptotic potential are independent properties of different CD4 epitopes, *Mol Immunol* (Band 34), Nr. 4, Seite 287-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9244341
- [187] Ulivieri, C.; Pacini, S.; Bartalini, S.; Valensin, S.; Telford, J. L. und Baldari, C. T. (1999): Obligatory cross-talk with the tyrosine kinases assembled with the TCR/CD3 complex in CD4 signal transduction, *Eur J Immunol* (Band 29), Nr. 8, Seite 2625-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10458777
- [188] Brdickova, N.; Brdicka, T.; Angelisova, P.; Horvath, O.; Spicka, J.; Hilgert, I.; Paces, J.; Simeoni, L.; Kliche, S.; Merten, C.; Schraven, B. und Horejsi, V. (2003): LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling, *J Exp Med* (Band 198), Nr. 10, Seite 1453-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14610046
- [189] Jacob, J.; Kassir, R. und Kelsoe, G. (1991): In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations, *J Exp Med* (Band 173), Nr. 5, Seite 1165-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1902502
- [190] Kelsoe, G. (2000): Studies of the humoral immune response, *Immunol Res* (Band 22), Nr. 2-3, Seite 199-210. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11339356
- [191] Smith, K. G.; Hewitson, T. D.; Nossal, G. J. und Tarlinton, D. M. (1996): The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci, *Eur J Immunol* (Band 26), Nr. 2, Seite 444-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617316
- [192] Cozine, C. L.; Wolniak, K. L. und Waldschmidt, T. J. (2005): The primary germinal center response in mice, *Curr Opin Immunol* (Band 17), Nr. 3, Seite 298-302. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15886120
- [193] Sze, D. M.; Toellner, K. M.; Garcia de Vinuesa, C.; Taylor, D. R. und MacLennan, I. C. (2000): Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 6, Seite 813-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10993912
- [194] Ellyard, J. I.; Avery, D. T.; Phan, T. G.; Hare, N. J.; Hodgkin, P. D. und Tangye, S. G. (2004): Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow, *Blood* (Band 103), Nr. 10, Seite 3805-12. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14701691

- [195] Vieira, P. und Rajewsky, K. (1988): The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice, *Eur J Immunol* (Band 18), Nr. 2, Seite 313-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3350037
- [196] Kaneko, M.; Kishihara, K.; Kawakita, T.; Nakamura, T.; Takimoto, H. und Nomoto, K. (1997): Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: hochu-ekki-to), *Immunopharmacology* (Band 36), Nr. 1, Seite 79-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9129999
- [197] Kaneko, M.; Kawakita, T. und Nomoto, K. (1999): Inhibition of eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity by a traditional Chinese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to), *Immunopharmacol Immunotoxicol* (Band 21), Nr. 1, Seite 125-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10084334
- [198] Weller, S.; Braun, M. C.; Tan, B. K.; Rosenwald, A.; Cordier, C.; Conley, M. E.; Plebani, A.; Kumararatne, D. S.; Bonnet, D.; Tournilhac, O.; Tchernia, G.; Steiniger, B.; Staudt, L. M.; Casanova, J. L.; Reynaud, C. A. und Weill, J. C. (2004): Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire, *Blood* (Band 104), Nr. 12, Seite 3647-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15191950
- [199] Klein, U.; Rajewsky, K. und Kuppers, R. (1998): Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 9, Seite 1679-89. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9802980

Abkürzungen

Abb. Abbildung

α CD4 anti-CD4, CD hier gleich engl. cluster of differentiation

Ag Antigen

Ak Antikörper

APZ Antigen präsentierende Zelle

BSA Rinderserumalbumin engl. bovine serum albumin

BTLA engl. B and T Lymphocyte Attenuator

bp Basenpaare engl. base pair

BZR B-Zell Rezeptor

cDNA komplementäre DNA engl. copy DNA (in DNA umgeschriebene RNA)

Con A Concanavalin A

CTLA-4 engl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4, auch CD152

DNA Desoxyribonukleinsäure engl. Deoxyribonucleic acid

dNTP Desoxyribonukleotidtriphosphat

DZ dendritische Zellen

EAE experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

FACS Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung engl. fluorescence activated cell sorting

FITC Fluoreszein-Isothiocyanat

FKS fötales Kälberserum

h Stunde

HPLC Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie engl. High Performance Liquid Chromatography

IL Interleukin

IFN- γ Interferon- γ

MACS magnetische Zellsortierung engl. magnetic cell sorting

MHC Haupthistokompatibilitätskomplex engl. major histocompatibility complex

min Minute

MS Multiple Sklerose

n.I. nach Immunisierung

PCR Polymerase Kettenreaktion engl. polymerase chain reaction

persl. persönliche

prim. primäre

R-EAE, EAE mit Remission und Rezidiv engl. relapsing-remitting EAE

RT Raumtemperatur

s.c. subkutan

sek. sekundäre

TNF- α Tumor Nekrose Faktor- α

TZR T-Zell Rezeptor

wt wildtyp

ZNS zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Persönliche Angaben	<p>Name: Dagmar Gärtner</p> <p>Familienstand: ledig</p> <p>Staatsangehörigkeit: deutsch</p> <p>Geburtsdatum: 29.07.1975</p> <p>Geburtsort: Stollberg</p> <p>Email: gaertner@drfz.de</p> <p>Adresse: Hiddenseer Str.9, 10437 Berlin, Fon: 44718282</p>
Schul Ausbildung	<p>1982 – 1990 Polytechnische Oberschule in Chemnitz/Sachsen</p> <p>1990-1994 Gymnasium an der Hohen Straße in Chemnitz/Sachsen</p> <p>1994 Abitur</p>
Hochschul- ausbildung	<p>1994-2000 Studium der Biologie an der Universität Leipzig/Sachsen</p> <p>1997-1998 Studentin an der Université des Sciences et Technologies de Lille / Frankreich (Immunologiekurse, Prof. Dr. M. Salzet)</p> <p>1999-2000 Diplomarbeit über <i>Die Funktion des Aktinzytoskelettes bei der Aktivierung humaner Monozyten durch LPS unter Einfluß von aktin- und immunmodulierenden Substanzen</i> unter Leitung von Prof. Dr. S. Hauschildt an der Universität Leipzig</p> <p>ab 2001 Doktorandin an der Humboldt Universität Berlin, Betreuer: Prof. Dr. R. Lucius und PD Dr. M.C. Brunner-Weinzierl</p>
Stipendien	<p>Juli-August 2003 Forschungsaufenthalt am Institut für Zell-, Tier- und Populationsbiologie an der Universität zu Edinburgh, Schottland, bei Prof. D. Gray, gefördert durch ein</p>

Kurzzeitstipendium des DAAD

Juli 2003 – Juni 2004 Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses (Nafög) der Humboldt Universität Berlin

Juli 2004 Reisestipendium der GlaxoSmithkline Stiftung zur Teilnahme am 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of FOCIS in Montreal, Kanada

Berlin, den 22.02.06

.....

Dagmar Gärtner

Publikationsliste und Kongressbeiträge

- Poster/Vorträge Nov. 2000
- Poster auf der Herbsttagung der DGfI zum Thema *Actin-modulating substances have dramatic effects on the LPS-triggered respiratory burst in human monocytes* in Düsseldorf, Deutschland
- März 2002
- Vortrag auf der Frühjahrstagung der DGfI zum Thema *Surface expression of CTLA-4 on murine B lymphocytes* in Halle, Deutschland
- Aug. 2003
- Vortrag am Institut für Zell-, Tier- und Populationsbiologie an der Universität zu Edinburgh zum Thema *CTLA-4 in murine B lymphocytes* in Edinburgh, Schottland
- Sept. 2003
- Vortrag + Poster auf dem 8th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity zum Thema *Surface CD152 is expressed on B cells* in Berlin, Deutschland
- Sept. 2003
- Poster auf dem 34. Treffen der DGfI in Berlin zum Thema *T cell dependent expression of surface CD152 (CTLA-4) on individual B cells* in Berlin, Deutschland
- Juli 2004
- Poster auf dem 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of FOCIS zum Thema *T cell dependent expression of surface CD152 (CTLA-4) on individual B cells* in Montreal, Kanada

Sept. 2005

Poster auf dem 36. Treffen der DGfI in Kiel zum Thema *CD25
regulatory T cells control late but not primary remission in EAE:
impact on long-term disease progression* in Kiel, Deutschland

Publikationen

Gärtner, D., Hoff, H., Gimsa, U., Burmester, G.-R. und Brunner-Weinzierl, M.C. *CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression* J. Neuroimmunol, 14. Dez. 2005, Epub ahead of print

Gärtner, D., Hoff, H., Burmester, G.-R. und Brunner-Weinzierl, M.C. *The role of CTLA-4 expression on B cells in TD immune responses*, Manuskript in Vorbereitung

Pandiyan, P., **Gärtner, D.**, Soezeri O., Radbruch A., Schulze-Osthoff K. und Brunner-Weinzierl, M.C. *CD152 (CTLA-4) Determines the Unequal Resistance of Th1 and Th2 Cells against Activation-induced Cell Death by a Mechanism Requiring PI3 Kinase Function* J. Exp. Med. 2004 Mar; 199(6):831-42.

Rossol, M., **Gärtner D.** und Hauschildt, S.
Diverse regulation of microfilament assembly, production of TNF-alpha, and reactive oxygen intermediates by actin modulating substances and inhibitors of ADP-ribosylation in human monocytes stimulated with LPS.

Cell Motil Cytoskeleton. 2001 Feb;48(2):96-108.

Pandiyan, P., Hegel, K., **Gärtner, D.**, Burmester, G.-R. und Brunner-Weinzierl, M.C. *Bifurcation in CD152 mediated signals regulating cytokine and proliferation in primary CD8 cells* Manuskript in Vorbereitung

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Frau Monika Brunner-Weinzierl für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung während der Promotion und Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von M. Brunner-Weinzierl am DRFZ, insbesondere Holger Hoff und Heike Hirsland für die Unterstützung bei der Durchführung verschiedener Arbeitsschritte.

Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die Bereitstellung aller Ressourcen am DRFZ und für die anregenden Diskussionen zu dieser Arbeit in den zahlreichen Seminaren. Prof. Dr. Gerd R. Burmester danke ich für die Unterstützung bei der Publikation, welche aus dieser Arbeit hervorgegangen ist. Dr. Ulrike Gimsa möchte ich ganz herzlich für die Hilfe bei der Erstellung der Gewebsschnitte und histologischen Färbungen innerhalb dieser Doktorarbeit danken.

Dr. Simon Fillatreau und Prof. David Gray danke ich für den Forschungsaufenthalt am Institut für Zell-, Tier- und Populationsbiologie an der Universität zu Edinburgh und der experimentellen und ideologischen Unterstützung bei der Etablierung der Knochenmarkschimären.

Prof. Dr. Richard Lucius möchte ich für die Unterstützung und Betreuung während der Promotion danken.

Desweiteren möchte ich Frau PD Dr. G. Riemekasten danken.

Für die Anreicherung der Zellen am FACS Diva möchte ich mich bei Katharina Raba und Toralf Kaiser aus dem Zellsortierlabor bedanken.

Für die Herstellung und Kopplung verschiedener Antikörper und die Unterstützung bei der Bereitstellung von Medien für die Zellkultur möchte ich mich bei Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann und Tuula Geske, den Labormanagern, bedanken. Ich möchte Kai Höhlig für die Hilfe bei der Generierung von dendritischen Zellen danken.

Im Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des DRFZ, die stets Hilfsbereit bei Fragen und Problemen zur Seite standen.

Bei meiner Familie möchte ich mich für den Zuspruch und die Aufmunterung während der gesamten Zeit der Entstehung dieser Doktorarbeit bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Andreas Quandt bedanken, der mich in all den Jahren tatkräftig unterstützt hat und mir jederzeit neuen Ansporn gab.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Dagmar Gärtner, geb. 29.07.1975 in Stollberg, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 22.02.06

.....

Dagmar Gärtner